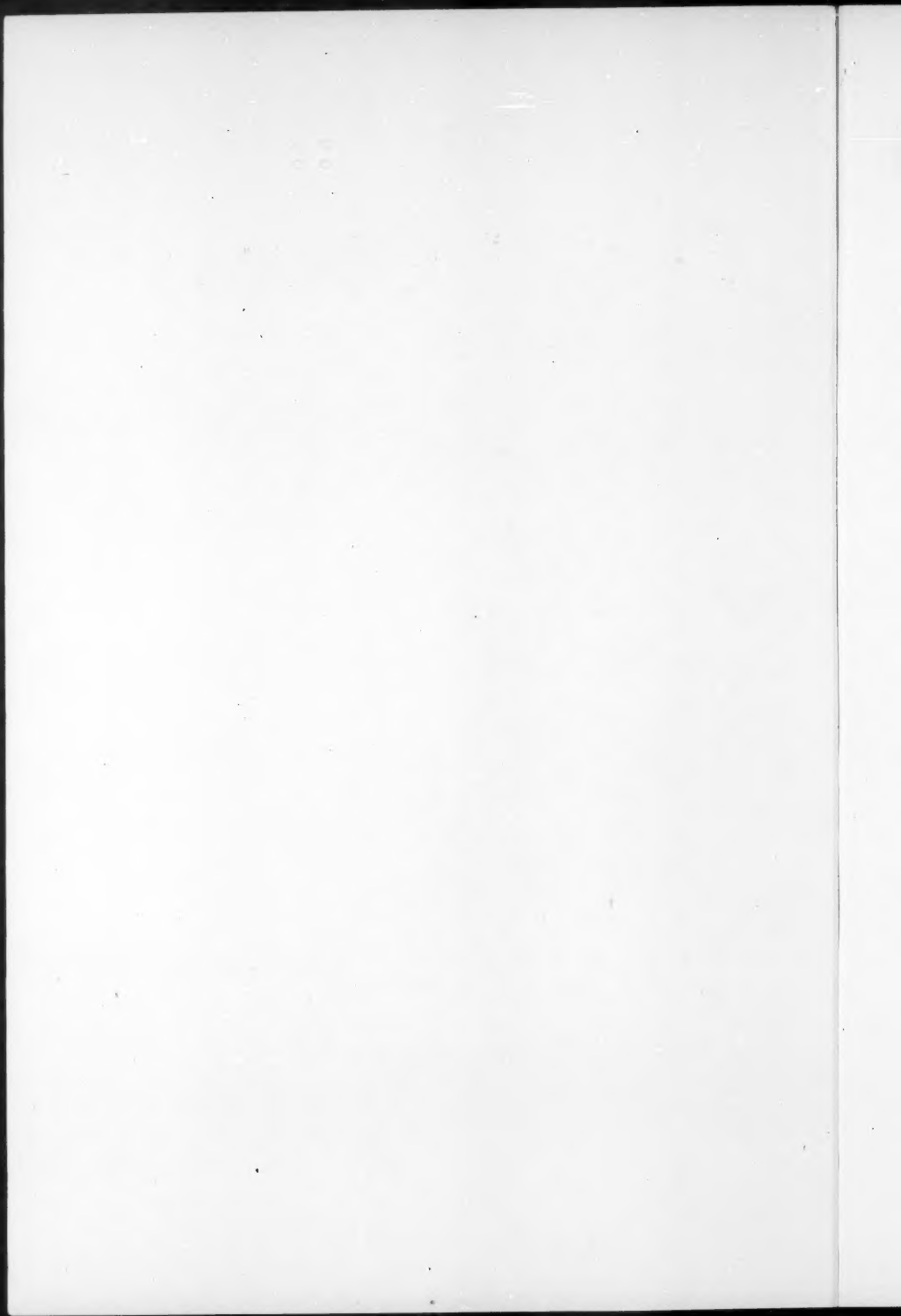


# CHROMOSOMA

9. BAND



# CHROMOSOMA

HERAUSGEGEBEN VON

H. BAUER WILHELMSHAVEN	•	T. CASPERSSON STOCKHOLM	•	C. D. DARLINGTON OXFORD
TH. DOBZHANSKY NEW YORK	•	L. GEITLER WIEN	•	A. MÜNTZING LUND
F. OEHLKERS FREIBURG I. BR.	•	F. SCHRADER NEW YORK	•	J. SEILER ZÜRICH

9. BAND

MIT 372 TEXTABBILDUNGEN UND 1 FALTТАFEL



SPRINGER-VERLAG  
BERLIN • GÖTTINGEN • HEIDELBERG  
1957/58

CHROMOSOMA

Alle Rechte vorbehalten  
Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages  
ist es auch nicht gestattet, einzelne Beiträge oder Teile daraus  
auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen  
Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg

Printed in Germany

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in  
dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der An-  
nahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetz-  
gebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften

Unveränderter Nachdruck 1975  
Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg · New York  
Druck: Franz Wolf, Heppenheim



## Inhalt des 9. Bandes

### 1. Heft

(Abgeschlossen am 12. Dezember 1957)

	Seite
RIEGER, R., Inhomologenpaarung und Meioseablauf bei haploiden Formen von <i>Antirrhinum majus</i> L. Mit 21 Textabbildungen . . . . .	1
DAVIDSON, D., The irradiation of dividing cells. I. The effects of x-rays on prophase chromosomes. With 5 Figures in the Text . . . . .	39
JOHN, B., The chromosomes of zooparasites. II. <i>Oswaldocruzia filiformis</i> (Nematoda: Trichostrongylidae). With 24 Figures in the Text . . . . .	61
LEWIS, K. R., and B. JOHN, The organisation and evolution of the sex multiple in <i>Blaps mucronata</i> . With 20 Figures in the Text . . . . .	69
TSCHERMAK-WOESS, E., und R. DOLEŽAL-JANISCH, Über das Chromosomen- und Kernwachstum in der Wurzel von <i>Haemanthus</i> . Mit 4 Textabbildungen. . . . .	81

### 2. Heft

(Abgeschlossen am 29. März 1958)

HADDER, J. C., and G. B. WILSON, Cytological assay of C-mitotic and prophase poison actions. With 10 Figures in the Text . . . . .	91
WALKER, B. E., Polyploidy and differentiation in the transitional epithelium of mouse urinary bladder. With 9 Figures in the Text . . . . .	105
SIRLIN, J. L., and G. R. KNIGHT, The pattern of protein sulphur after Feulgen hydrolysis in the salivary gland chromosomes of <i>Drosophila melanogaster</i> . With 19 Figures in the Text . . . . .	119
MAINX, F., Chromosomaler Strukturpolymorphismus bei einer <i>Zaprionus</i> -Art	160
ROTHERFELS, K. H., and L. SEMINOVITCH, The chromosome complement of the Rhesus monkey ( <i>Macaca mulatta</i> ) determined in kidney cells cultivated in vitro. With 3 Figures in the Text . . . . .	163
ROWLANDS, D. G., The control of chiasma frequency in <i>Vicia faba</i> L. With 1 Figure in the Text . . . . .	176
REES, H., Differential behaviour of chromosomes in <i>Scilla</i> . With 3 Figures in the Text . . . . .	185

### 3. Heft

(Abgeschlossen am 14. Juli 1958)

SCHRADER, F., and S. HUGHES-SCHRADER, Chromatid autonomy in <i>Banasa</i> (Hemiptera: Pentatomidae). With 54 Figures in the Text . . . . .	193
DAVIDSON, D., The effect of heat shocks on cell division. With 3 Figures in the Text . . . . .	216
SRINIVASACHAR, D., and K. PATAV, Reductional groupings in cold-treated onion roots. . . . .	229
RIEGER, R., und A. MICHAELIS, Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von <i>Vicia faba</i> L. I. Der Einfluß der Unterwasser-Quellung der Samen auf die chromosomale Aberrationsrate. Mit 7 Textabbildungen . . . . .	238
REITBERGER, A., und E. BUCHNER, Zur Karyologie der Meiose des Lebermooses <i>Sphaerocarpos donnellii</i> . Mit 15 Textabbildungen . . . . .	258

## 4. Heft

(Abgeschlossen am 1. Oktober 1958)

	Seite
GLÄSS, E., Aneuploide Chromosomenzahlen in den Mitosen der Leber verschiedener alter Ratten. Mit 6 Textabbildungen . . . . .	269
TING, Y. C., On the origin of abnormal chromosome 10 in maize ( <i>Zea Mays</i> L.). With 5 Figures in the Text . . . . .	286
SHAW, G. W., Adhesion loci in the differentiated heterochromatin of <i>Trillium</i> species. With 5 Figures in the Text . . . . .	292
BHATTACHARJYA, S. S., Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Kerne mit verschiedener heterochromatischer Konstitution. Mit 9 Textabbildungen .	305
BAJER, A., Cine-micrographic studies on chromosome movements in $\beta$ -irradiated cells. With 6 Figures in the Text . . . . .	319
MOLÉ-BAJER, J., Cine-micrographic analysis of C-mitosis in endosperm. With 15 Figures in the Text . . . . .	332

## 5. Heft

(Abgeschlossen am 26. Oktober 1958)

DIETZ, R., Multiple Geschlechtschromosomen bei den cypriden Ostracoden, ihre Evolution und ihr Teilungsverhalten. Mit 32 Textabbildungen . .	359
KEYL, H.-G., Untersuchungen am Karyotypus von <i>Chironomus thummi</i> . II. Mitteilung. Strukturveränderungen an den Speicheldrüsenchromosomen nach Röntgenbestrahlung von Embryonen und Larven. Mit 21 Textabbildungen	441
KRACZKIEWICZ, Z., et B. MATUSZEWSKI, Observations sur une structure atypique des chromosomes salivaires de certains cécidomyiides. Avec 17 Figures dans le Texte . . . . .	484

## 6. Heft

(Abgeschlossen am 5. Dezember 1958)

FOGWILL, M., Differences in crossing-over and chromosome size in the sex cells of <i>Lilium</i> und <i>Fritillaria</i> . With 9 Figures in the Text . . . . .	493
OKSALA, T., and E. THERMAN, The polarized stages in the meiosis of liliaceous plants. With 11 Figures in the Text . . . . .	505
MICHAELIS, A., und R. RIEGER, Cytologische und stoffwechselphysiologische Untersuchungen am aktiven Meristem der Wurzelspitze von <i>Vicia faba</i> L. II. Mitteilung. Präferentielle Verteilung der chromosomalen Bruch- und Reunionpunkte nach anaerober Quellung der Samen. Mit 8 Textabbildungen . . . . .	514
BRUN, J., et D. CHEVASSU, L'évolution des structures chromatiniennes dans les cellules nourricières des ovocytes chez <i>Drosophila melanogaster</i> MEIGEN. Avec 11 Figures dans le Texte . . . . .	537
KUNZE-MÜLL, E., und E. MÜLLER, Weitere Untersuchungen über die chromosomale Struktur und die natürlichen Strukturtypen von <i>Drosophila subobscura</i> COLL. Mit 1 Faltafel . . . . .	559

## 7. (Schluß-)Heft

(Abgeschlossen am 12. Dezember 1958)

McCOLLUM, G. D., Comparative studies of chromosome pairing in natural and induced tetraploid <i>Dactylis</i> . With 15 Figures in the Text . . . . .	571
DAS, N.K., K. PATAU und F. SKOOG, Autoradiographic and microspectrophotometric studies of DNA synthesis in excised tobacco pith tissue. With 4 Figures in the Text . . . . .	606
Register . . . . .	618

Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie der  
Wissenschaften zu Berlin in Gatersleben

# INHOMOLOGENPAARUNG UND MEIOSEABLAUF BEI HAPLOIDEN FORMEN VON ANTIRRHINUM MAJUS L.

Von

RIGOMAR RIEGER

Mit 21 Textabbildungen

(Eingegangen am 26. Juli 1957)

## Inhalt

I. Einleitung . . . . .	1
II. Material und Methodik . . . . .	2
III. Ergebnisse. Der Meioseablauf . . . . .	2
a) Die Prophase und die erste meiotische Teilung bis zur Interkinese . . . . .	2
b) Die zweite meiotische Teilung . . . . .	26
IV. Diskussion . . . . .	30
a) Die prophasische Intrahaploidpaarung . . . . .	30
b) Die Chiasmabildung und die Natur der in Meta-Anaphase I auftretenden Paarungsverbände bei <i>A. majus</i> . . . . .	33
c) Phylogenetische Ausblicke . . . . .	35
Summary . . . . .	36
Literatur . . . . .	37

## I. Einleitung

Die letzten zusammenfassenden Arbeiten zum Haploidieproblem stammen von IVANOW (1938) und KOSTOFF (1942). Seitdem ist eine Reihe von wichtigen Arbeiten zum Meioseablauf monohaploider (aus diploiden Arten entstandener) Formen erschienen, welche es erforderlich machen, die auch heute noch voll aufrechterhaltene These von der Paarung ausschließlich homologer Chromosomen in der Prophase der ersten meiotischen Teilung einer Revision zu unterziehen. Alle diese Arbeiten postulieren oder weisen eine  $\pm$  ausgeprägte meiotische Paarung der inhomologen Chromosomen des jeweiligen haploiden Satzes nach (LEVAN 1942, 1945; PERSON 1954), die nach der oben genannten These nicht zu erwarten wäre, wenn es sich beim Paarungsvorgang stets um Prozesse handelte, die ganz spezifisch und an die Identität relativ kleiner, chromosomaler Teilabschnitte gebunden sind. Schon früher wurde von MCCLINTOCK (1932), LAMMERTS (1934), CATCHESIDE (1932) und ERNST (1940) auf Paarungsvorgänge zwischen inhomologen Chromosomen hingewiesen, wobei teils eine echte Paarung inhomologer Segmente nachgewiesen (MCCLINTOCK, LAMMERTS, ERNST) oder aber Duplikationen für die Paarung verantwortlich gemacht wurden (CATCHESIDE). Diese Arbeiten gaben Veranlassung, das Problem des Meiose-

ablaufes bei haploider Chromosomenzahl an *Antirrhinum majus* unter besonderer Berücksichtigung der meiotischen Prophase noch einmal zu bearbeiten, wobei sich das Hauptinteresse auf das Wesen und Ausmaß des Paarungsablaufes der Haploiden konzentrieren sollte. Die ersten cytologischen Untersuchungen an der Mikrosporangese haploider Formen von *A. majus* gehen auf ERNST (1940) zurück.

## II. Material und Methodik

Bei den zur Untersuchung der Mikrosporangese herangezogenen Pflanzen handelt es sich um in der Sippe 50 und in den Nachkommenschaften einer schmalblättrigen Variante „angusta“ aufgetretene haploide Formen mit 8 Chromosomen. Sie stimmen alle morphologisch mit den von KNAPP (1939) für die Sippe 50 beschriebenen Haploiden vollständig überein und wurden durch Stecklinge vegetativ vermehrt. Alle Fixierungen (Alkohol-Eisessig 3:1) wurden an Gewächshauspflanzen vorgenommen, und zur Untersuchung des Meioseablaufes wurden die Antheren in Eisen-Karmin-Essigsäure gefärbt und in 50%iger Essigsäure gequetscht. Ein Teil der Präparate wurde nach Gefrieren auf Trockeneis, Entfernung des Deckglases, kurzer Aufbewahrung in 96%igem Alkohol mit Euparal zu Dauerpräparaten verarbeitet (Methodik nach CONGER und FAIRCHILD 1953).

Optik: Zeiss-Lumipan Forschungsmikroskop. Die Aufnahmen wurden z. T. mit der Zeiss-Miflex, z. T. mit der Zeiss-Standardkamera hergestellt; wo es sich um Phasenkontrastaufnahmen handelt, sind diese im Abbildungstext durch den Hinweis „Phako“ gekennzeichnet.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. STUBBE, Herrn Dr. F. MECHELKE, Herrn Dipl.-Phys. F. BARNETZKY und Herrn Dipl.-Agr. A. MICHAELIS bin ich für Ratschläge und Hinweise bei der Durchführung der Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

## III. Ergebnisse. Der Meioseablauf

Im Hinblick auf den zeitlichen Einsatz und den phasenmäßigen Ablauf der Meiose wurde zuerst die für eine ganze Reihe haploider Formen typische Tatsache erkennbar, daß der Meioseablauf durch eine deutliche, den diploiden Formen gegenüber stark erhöhte, aber im Einzelfall unterschiedlich klar ausgeprägte Asynchronie ausgezeichnet ist. Der Prophasebeginn erfolgte dabei für den ganzen Loculus zeitlich gleichmäßig. Im weiteren Verlauf der Meiose traten dann die z. T. sehr ausgeprägten Unterschiede den diploiden Formen gegenüber auf. In manchen Präparaten ließen sich alle Stadien der beiden meiotischen Teilungen bis zur Telophase II nebeneinander finden, wobei aber die Stadienverteilung im Loculus nicht willkürlich war, sondern Striche oder Nester mit phasengleichen Pollenmutterzellen (PMZ) auftraten. Nach ihrer Lage im Loculus waren diese Bereiche in den Quetschpräparaten allerdings nicht näher zu kennzeichnen. In allen Fällen nahm die Asynchronie in der Meiose II stark ab. In fast allen Präparaten mit Sporaden oder bereits fertigen Pollen traten entweder einzeln oder in Gruppen Prophasezellen bis zum Pachytän auf, während dazwischenliegende Stadien fehlten. Es handelte sich dabei wohl um aus unbekannten Gründen im Teilungsablauf gestoppte PMZ, die später degenerierten.

### a) Die Prophase und die erste meiotische Teilung bis zur Interkinese

Im Leptotän waren die 8 Chromosomen des haploiden Satzes, die als lange, dünne, einsträngige Strukturen auftraten, in ihrer ganzen

Länge nicht verfolgbar. Sie wiesen z. T. einen Chromomerenbau auf, ihre Strukturierung beschränkte sich aber in manchen Fällen auf wenige, stärker färbare Abschnitte. Im allgemeinen trat ein Nukleolus auf, seltener zwei oder drei.

Das Auftreten abschnittsweise gepaarter und ungepaarter Chromosomen kennzeichnete das Einsetzen des Zygotäns. Die Analyse ganzer Kerne war in diesem Stadium unmöglich. Im großen ganzen entsprach das Bild der Zygotänkerne dem, das bei Vorhandensein einer Reihe von Duplikationen im haploiden Chromosomensatz zu erwarten wäre, wenn von der These ausgegangen wird, daß nur exakt homologe Segmente paaren.

Es läßt sich also in diesem Stadium bereits die Aussage machen, daß bei *A. majus* Intrahaploidpaarungen zwischen den Chromosomen des haploiden Satzes erfolgen. Wären die Paarungsvorgänge in spezifischer Weise auf homologe Abschnitte beschränkt, müßte hier bereits das Endstadium der Paarung erreicht sein. Statt dessen traten aber im weiteren Meioseverlauf typische Pachytäne mit einem hohen Paarungsausmaß auf, auf die ERNST (1940) zum ersten Male hinwies und schrieb: „Leider ist hier im Gegensatz zu den diploiden Pflanzen eine vollkommene Pachytänanalyse nicht durchzuführen, da die Chromosomen nicht als Paare auftreten, sondern komplexe Verbindungen eingehen“. Diese Feststellung besteht teilweise, wie gleich noch näher zu erläutern sein wird, zu Recht. Tatsächlich ist die Situation aber insofern günstiger, als bei Untersuchung eines ausreichend großen Materials durchaus Paarungsverbände im Pachytän zu verfolgen und auch ganze Kerne zu analysieren sind.

Es ergab sich, daß die Paarung der Chromosomen des haploiden Satzes in der überwiegenden Mehrzahl der PMZ im Pachytän vollständig war, d. h. alle 8 Chromosomen über ihre ganze Länge einen Paarungspartner gefunden hatten. Außer den Kernen mit vier Bivalenten traten auch noch komplexe Paarungsverbände mit Partnerwechsel und abschnittsweise univalenten Chromosomen auf.

In vielen Fällen war die Synchronie des Kernteilungsablaufes bis zum Pachytän gewahrt, und aus dem fast ausschließlichen Auftreten völlig oder sehr weitgehend gepaarter Chromosomen läßt sich der Schluß ziehen, daß im Normalfall ein sehr hohes, im Extrem fast 100%iges Paarungsausmaß erreicht wird. Traten neben Pachytänen noch PMZ mit  $\pm$  unvollkommener Paarung auf, ließ sich allerdings nicht entscheiden, ob es sich dabei um Zygotäne handelte, bei denen die Paarung ihren Abschluß noch nicht erreicht hatte, oder um Kerne, deren Paarung unvollkommen geblieben war.

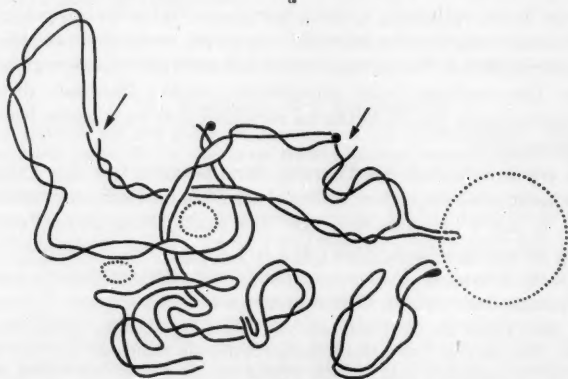
Daß nicht alle derartigen Zellen in diesem Stadium dem Zygotän zugerechnet werden dürfen, darauf deutete das Auftreten von PMZ mit partiell ungepaarten Chromosomen in Präparaten hin, in denen die Mehrzahl der Zellen bereits eine sehr viel spätere Phase des Teilungsablaufes (Telophase II, Sporaden) erreicht hatte. Das bedeutet, daß das Paarungsausmaß innerhalb des Chromosomensatzes

zwar im allgemeinen sehr hoch ist, aber eine gewisse Variabilität in der Vollkommenheit aufweist.

Im Vordergrund des Interesses steht das Wesen dieser Paarung, d. h. die Frage, ob es sich dabei um eine echte oder um eine „Schein-



a

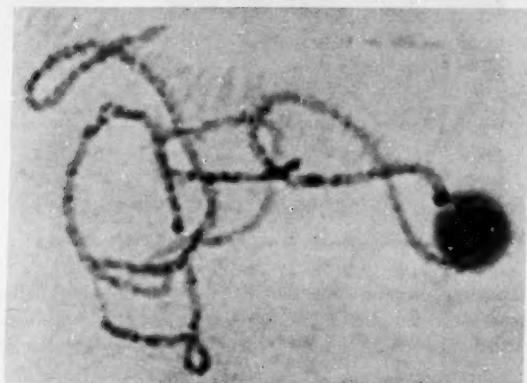


b

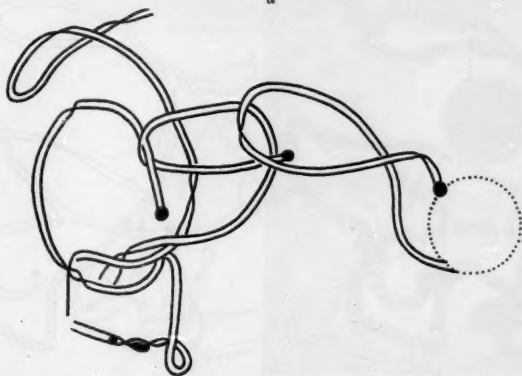
Abb. 1a u. b. Frühes Pachytän mit zwei in-sich-gepaarten Univalenten. Die sechs restlichen Chromosomen des haploiden Satzes sind auf Grund einer Telomerenaktivität endweise untereinander verknüpft. (Die Pfeile kennzeichnen die vermutlichen Enden der Zweilerverbände.) (3000 x)

paarung“ handelt. Es wäre möglich, daß eine echte Paarung zwar in ausdehnungsmäßig begrenzten, eventuell im haploiden Chromosomensatz vorliegenden duplizierten Segmenten mit homologer genetischer Struktur erfolgt und diese Paarung sich als einfache Torsion fortsetzt,

die als Scheinpaarung zu bezeichnen wäre und ihre Ursache rein passiv in Windungskräften auf der Molekularebene finden könnte (DARLINGTON 1937). Gegen eine solche Vermutung sprechen die in den Abb. 2—6 wiedergegebenen Aufnahmen von Kernen im Pachytänstadium. Die



a



b

Abb. 2a u. b. Pachytän mit vier Bivalenten (3000 ×)

Bilder sagen klar aus, daß die Paarung, abgesehen von sehr kleinen, in der Häufigkeit je Kern stark unterschiedlichen, ungepaarten Abschnitten und begrenzten Torsionen, sich nicht von der diploider Formen der Sippe 50 unterscheidet (Abbildung zur Sippe 50 s. ERNST 1938, MECHTELKE und STUBBE 1954). Der einzige auffällige Unterschied gegenüber diesen Pachytänen mit der doppelten Chromosomenzahl lag in einer

weniger genauen lagemäßigen Gegenüberordnung der Chromomeren. Im frühen Pachytän nachweisbare Torsionen der Partner umeinander wurden in fast allen Fällen später unsichtbar.

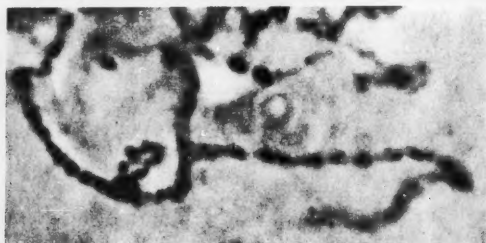


Abb. 3. Trivalent mit dem Ort des Partnerwechsels (3000  $\times$ )

Die Paarung begann mit einem relativ losen Parallellegen der Paarungspartner. Zu diesem Zeitpunkt waren die Paarungsverbände noch deutlich als aus zwei jeweils nebeneinander liegenden Einheiten



a



b

Abb. 4a u. b. Pachytän mit zwei Bivalenten, einem Trivalent und einem in-sich-gepaarten Univalent (3000  $\times$ )

bestehend zu erkennen. Streckenweise waren die beiden Paarungspartner auf Grund engeren Kontaktes nicht mehr einzeln erkennbar. Einen Pachytänkern in diesem Stadium des Paarungsbeginnes gibt die Abb. 1 wieder. Auf diesen Kern wird in einem anderen Zusammenhang noch näher eingegangen. Mit dem Eintritt eines echten Kontaktes



zwischen den beiden nebeneinander liegenden Paarungspartnern fanden die Paarungsvorgänge ihren Abschluß.

Pachytäne mit 4 Bivalenten stellen einen Extremfall dar und wurden in einer ganzen Reihe von Fällen gefunden (Abb. 2). Abgesehen von

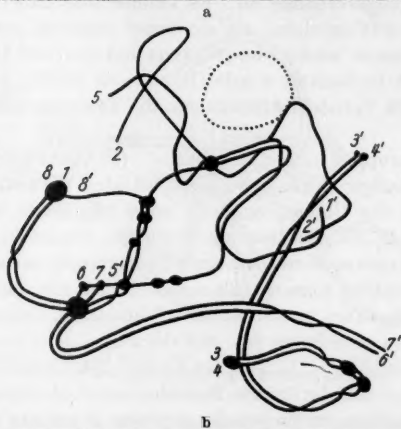
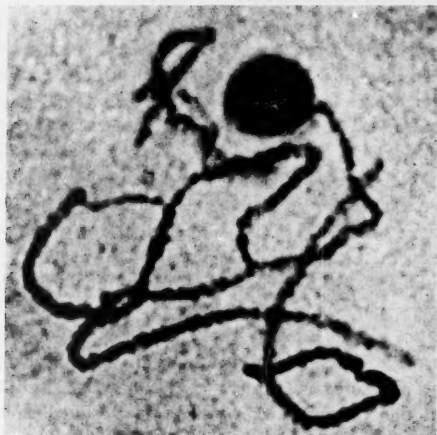


Abb. 5a u. b. Ein bezüglich des Paarungsverhaltens der Chromosomen hochkomplexes, nicht mehr mit Sicherheit analysierbares Pachytän (3000  $\times$ )

kleinen Paarungslücken und überstehenden univalenten Chromosomenenden auf Grund von Größenunterschieden der Paarungspartner war die Paarung vollständig.

Neben den Bivalenten traten in einigen Fällen im Pachytän auch Trivalente auf (Abb. 3, 4). Aus mehr als drei Paarungspartnern bestehende Chromosomenverbände, deren mögliches Auftreten sich aus den späteren Stadien der Meiose I ableiten läßt, waren im Pachytän mit Sicherheit nicht nachweisbar.

In der Mehrzahl der Fälle wurden in ihrem Paarungsverhalten sehr komplexe Pachytäne gefunden, sie waren aber nicht mehr mit der nötigen Sicherheit zu analysieren. Ein bezüglich des Paarungsverhaltens schon recht komplexes Pachytän mit z. T. gepaarten, z. T. über  $\pm$  lange Strecken univalenten Chromosomen und Partnerwechsel zeigt die Abb. 5. In der Schemaskizze ist der vermutliche Verlauf der acht Chromosomen angegeben. Dabei handelt es sich aber nur um die wohl wahrscheinlichste, wenn auch nicht einzig mögliche Deutung der im Kern erfolgten Paarung. Die jeweiligen Chromosomenenden sind in diesem Fall zur besseren Übersicht mit Zahlen gekennzeichnet worden.

Erschwerend kam bei der Pachytänanalyse hinzu, daß relativ häufig Endverbindungen der Chromosomen oder Bivalente einzutreten schienen, die es bei sehr festen Endkontakten der Paarungsverbände in den meisten Fällen unmöglich machten, das Ende eines Paarungsverbandes mit Sicherheit festzulegen. Abb. 1 zeigt derartige Endverbindungen. Die Pfeile in der Schemaskizze geben die vermutlichen Enden der einzelnen Paarungsverbände an. Es könnte sich dabei um eine Art Telomerenaktivität handeln, wie sie unter anderem von *Drosophila*-Riesenchromosomen bekannt ist (WATERS und GRIFFEN 1950) und auch bei *Chironomus* beobachtet wurde (BEERMANN 1952). Auch in diesen Fällen haben die Terminalchromomeren die Tendenz, untereinander zu fusionieren.

In-Sich-Paarungen oder „fold backs“ (McCLINTOCK 1932) waren eine relativ häufige Erscheinung und betrafen entweder ganze Univalente, wobei die Umbiegungsstelle meist ungepaart blieb, oder sie umfaßten nur in der Ausdehnung begrenzte Segmente von Chromosomen, die in anderen Bereichen einen Paarungspartner aufwiesen. Der in Abb. 1 dargestellte Kern enthält mit Sicherheit ein, aller Wahrscheinlichkeit nach aber zwei in-sich-gepaarte Univalente, deren Lage aus der Schemaskizze zu entnehmen ist. Auf derartige „fold backs“ innerhalb der Paarungsverbände ist bereits von ERNST (1940) hingewiesen worden. Ob es sich dabei um duplizierte Bereiche innerhalb eines Chromosoms oder um inhomologe, untereinander gepaarte Segmente eines Chromosoms handelt, läßt sich schwer entscheiden. Möglicherweise kommt beides vor. Daß Homologien bei der In-sich-Paarung eventuell eine Rolle spielen können, läßt sich aus einer in allen untersuchten Pflanzen hin und wieder gefundenen speziellen, univalenten Paarungskonfiguration ableiten. Dabei handelt es sich um einen Spezialfall der In-Sich-

Paarung eines Chromosoms, der zur Ringbildung Anlaß gibt (Abb. 6). Derartige Ringe traten immer wieder in einer mit dem Spiralisationsgrad etwas schwankenden Größe auf und können nur so interpretiert werden, daß in beiden Armen des Chromosoms — sofern man keine Isochromo-

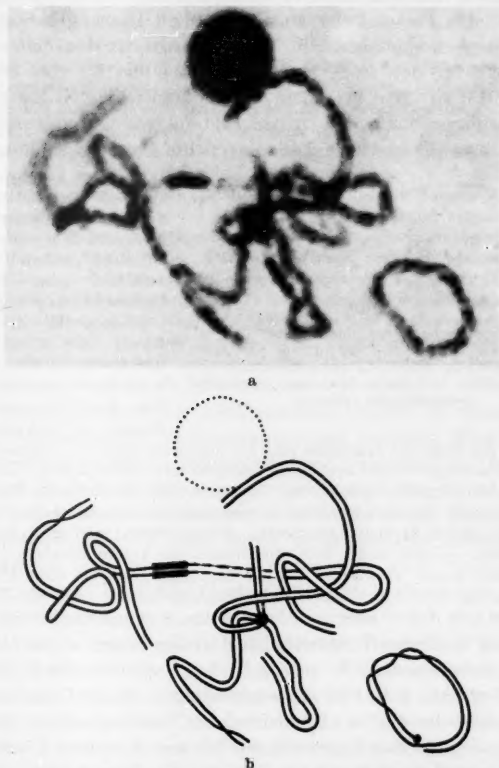


Abb. 6a u. b. Pachytän mit drei Bivalenten, einem ringförmig und einem weiteren, durch Umklappen in-sich-gepaarten Univalent (3000  $\times$ )

somenstruktur annehmen will — gegeneinander invertierte, duplizierte Bereiche vorliegen. In keinem Ring wurden überstehende Enden gefunden. Abb. 7 gibt die vermutlichen Strukturverhältnisse schematisch wieder.

Nach dem Geschilderten ist es eine nicht zu bezweifelnde Tatsache, daß eine nicht-homologe Paarung erheblichen Ausmaßes bei haploiden

Formen von *A. majus* auftritt, die sich von der Paarung zwischen echt homologen Abschnitten, wie sie bei Diploiden gefunden wurde, nur in für das Phänomen selbst unbedeutend erscheinenden Aspekten unterscheidet und bei regelmäßigem Auftreten ein sehr hohes Ausmaß erreicht. Das bedeutet, daß zumindest unter bestimmten Voraussetzungen (hier Haploidie) das Postulat der ausschließlichen Paarung homologer Abschnitte für *A. majus* nicht gilt. Gleiches trifft für den Mais (McCLINTOCK 1932), für den Roggen (LEVAN 1941) und für die Zuckerrübe (LEVAN 1945) zu. Neu bei *A.* ist den anderen Objekten gegenüber das hohe Paarungsausmaß, das in der Bildung von 4 Bivalenten gipfelt, und außerdem die in vielen Fällen erreichte Paarungsvollkommenheit.

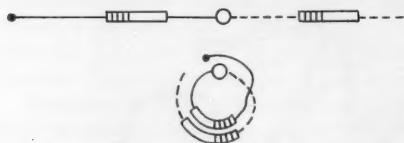


Abb. 7. Schematische Darstellung des ringförmig in-sich-gepaarten Univalents. Für diesen Paarungsmodus werden in beiden Chromosomenarmen befindliche, relativ invertierte, homologe Abschnitte verantwortlich gemacht

Es lag naturgemäß nahe, zu versuchen herauszufinden, ob die Paarungsvorgänge im Pachytän in irgendeiner Weise spezifisch sind, d. h. bevorzugt zwischen ganz bestimmten Chromosomen erfolgen.

Nach den Arbeiten von ERNST (1938/39) und MECHELKE und STUBBE (1954) ist es ohne besondere Schwierigkeiten möglich, die 8 Bivalente diploider Formen im Pachytän zu iden-

tifizieren. Im Falle der Haploidie sind im Gegensatz dazu alle Versuche, die am jeweiligen Paarungsverband beteiligten Chromosomen des haploiden Chromosomensatzes zu identifizieren, gescheitert. Während sich im diploiden Pachytän die 8 Bivalente nach der Lage bestimmter konstanter Strukturelemente (Endknöpfe, interkalare, stärker färbbare Abschnitte, diffuse Enden) und nach den Längenunterschieden — zwei lange, fünf mittellange, ein kurzes Bivalent — deutlich unterscheiden lassen, verwischen sich im haploiden Pachytän diese Unterschiede sehr stark, und eine Identifizierung der Paarungspartner trägt so viel fragliche Momente in sich, daß sie stark spekulativ bleiben muß und sinnlos wird.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Frage, ob im Verlauf der Paarung zwischen den Chromosomen des haploiden Satzes Chiasmata gebildet wurden, d. h. Crossing-over erfolgte. Nach DARLINGTON sind es die Chiasmata, die im allgemeinen den Fortbestand der in der Prophase angelegten Paarungsverbände bis zur Anaphase I ermöglichen. Fehlen sie, wird bei den meisten Objekten die Paarung vorzeitig gelöst, und die Chromosomen verhalten sich wie Univalente.

Im Diplotän besteht im allgemeinen die erste Möglichkeit, eine Aussage über Anlage oder Fehlen von Chiasmata zu machen. Dieses Stadium ist allerdings bei *A. majus* als Diffusstadium ausgebildet und scheidet deshalb für die Beurteilung der Chiasmabildung aus. Das Diffusstadium wurde bei *A. majus* von ERNST (1938) beschrieben und als Fixierungsartefakt gedeutet. Das regelmäßige Auftreten dieses Stadiums läßt diese Deutung ziemlich unsicher erscheinen, zumal der-

artige Stadien für eine große Zahl von pflanzlichen und tierischen Objekten beschrieben wurden (Literatur-Zusammenstellung bei TISCHLER 1951, S. 433). TISCHLER weist mit Recht darauf hin, daß bei fixierungsbedingter Entstehung dieses Stadiums die Frage nur lauten würde, warum gerade zu diesem Zeitpunkt im Meioseablauf der PMZ die Fixierungsstabilität so groß ist.

Bei den Haploiden tritt ebenso wie bei diploiden Formen von *A. majus* ein vollständiger Zerfall der Strukturen ein. Die Färbbarkeit läßt im allgemeinen nach und beschränkt sich auf stark angefärbte Bröckchen unregelmäßiger Form. Es wäre möglich, daß zu diesem Zeitpunkt Wachstumsvorgänge der PMZ erfolgen, da diese nach dem Diffusstadium vergrößert erscheinen. Eine exakte Untersuchung der Größenzunahme ist aber im Rahmen dieser Untersuchung nicht erfolgt.

An das Diffus- oder Regressionsstadium schließt sich die Diakinese an, die in ihrer zweiten Hälfte, nachdem die Chromosomen-Kontraktion schon weit fortgeschritten ist, die ersten Aussagen über die mit der Pachytänpaarung verknüpften Austauschvorgänge zwischen den Paarungspartnern zulassen könnte. Bei erfolgreichem Austausch und Chiasmabildung wäre zu erwarten, daß in der Diakinese  $\pm$  komplexe Paarungsverbände auftreten. Tatsächlich traten neben Diakinesekernen mit 8 Univalenten solche mit einem Zweierverband und mit zwei, drei und vier Zweierverbänden auf. Daneben wurden auch Dreierverbände neben Zweierverbänden und Univalenten in entsprechender Zahl gefunden. Seltener wurden Paarungsverbände mit mehr als 3 Chromosomen beobachtet.

Die Übersichtlichkeit der Diakinesekerne wurde in vielen Fällen durch interchromosomale Verbindungsstränge zwischen Einzelchromosomen oder Chromosomenverbänden erheblich eingeschränkt. Im Einzelfall war es deshalb keinesfalls immer möglich, eindeutig zu entscheiden, ob die in der Diakinese auftretenden Verbände durch Chiasmata zusammengehalten wurden oder durch derartige chromosomale Verbindungsstränge wohl matrixartiger Natur oder auch durch ein sog. „residual pairing“ im Sinne LEVANS (1941), d. h. durch gemeinsames Spiralisieren der Paarungspartner des Pachytäns.

Das Auftreten dieser nicht chiasmatischen Bindungen kann einen erheblichen Fehler in die Auszählung der Diakineseverbände hineinbringen, so daß Diakineseauswertungen im Hinblick auf die Chiasmabildung mit einem großen Unsicherheitsfaktor belastet bleiben. Aus diesem Grunde wurde oben statt von Bi- und Trivalenten von Zweier- und Dreierverbänden gesprochen, da im ersten Fall zur Entstehung der Paarungskonfiguration Chiasmata erforderlich sind, deren Auftreten aber nicht mit letzter Sicherheit zu konstatieren ist.

In den meisten Fällen wiesen die Paarungsverbände in der Diakinese lediglich Endverbindungen in einem Schenkel, selten in beiden auf. Das bedeutet, daß die Terminalisation etwa angelegter Chiasmata in der Diakinese bereits in den meisten Fällen abgeschlossen ist oder es sich um achiasmatische Pseudoverbände handelt. Kreuzförmige Zweierkonfigurationen, bedingt durch nicht oder noch nicht vollständig

terminalisierte Chiasmata, oder entsprechende Verklebungen, traten selten auf.

Häufig wurden in der Diakinese Univalente in Paarlage gefunden. Dabei handelte es sich wohl um im Pachytän als Paarungsverband aufgetretene Chromosomen, zwischen denen kein Austausch erfolgte und deren Zusammenhalt bei

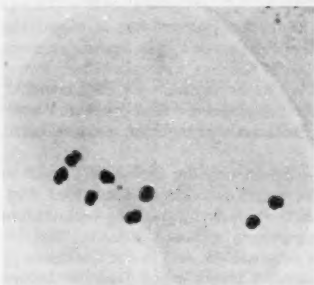


Abb. 8. Positionskorrelationen der acht univalenten Chromosomen in der Meta-Anaphase I (1500 ×)

fehlenden Matrixverbindungen vorzeitig gelöst wurde. In Paarlage angeordnete Chromosomen, die durch Matrixverbindungen in Kontakt standen, waren noch häufiger. Diese Matrixstränge dürften als Ergebnis einer gemeinsamen Matrixbeladung der im Pachytän gepaarten Chromosomen aufzufassen sein. Die diakinetischen Paarlagen mit und ohne Kontakt waren bis zur Meta-Anaphase I als sog. Positionskorrelationen (RIBBANDS 1938) zu verfolgen (Abb. 8).

Mit aller Vorsicht und unter Ausschaltung aller offensichtlichen Pseudoverbände, d. h. höchstwahrscheinlich nicht durch Chiasmata zusammengehaltener Verbände, durchgeführte Auswertungen von 406 mit

einiger Sicherheit zu deutender Diakinesezellen lassen unter gewissen Vorbehalten den Schluß zu, daß von den 3248 in ihnen enthaltenen

Chromosomen 1021, d. h. 31,43 %, als echte, chiasmatisch gebundene Verbände auftraten. Die Vorbehalte beziehen sich auf die nicht auszuschließende Möglichkeit, daß entweder alle oder ein Teil der chiasmatisch gedeuteten Paarungsverbände tatsächlich Pseudoverbände darstellen. Über diese Alternative soll aber vorerst bewußt hinweggesehen und die Verbände sollen unter dem Aspekt chiasmatischer Bindung der Paarungspartner behandelt werden. Die einzelnen in diesem Stadium gefundenen Paarungsverbände sind in Tabelle 1 aufgeführt und

Tabelle 1. *Diakinese-Verbände*

Konfiguration	%	% nach ERNST
8 I . . . . .	23,5	10,8
1 II + 6 I . . . . .	38,0	34,8
2 II + 4 I . . . . .	22,0	24,4
3 II + 2 I . . . . .	6,1	9,6
4 II . . . . .	1,2	—
1 III + 5 I . . . . .	3,9	5,2
1 III + 1 II + 3 I . . . . .	2,2	9,2
1 III + 2 II + 1 I . . . . .	0,5	—
2 III + 2 I . . . . .	0,2	0,8
1 IV + 4 I . . . . .	1,5	1,6
1 IV + 1 II + 2 I . . . . .	0,5	2,0
1 IV + 2 II . . . . .	0,2	0,4
1 V + 3 I . . . . .	—	0,8
1 VI + 1 II . . . . .	—	0,4
	100,0	100,0

den 1938 von ERNST ermittelten Werten gegenübergestellt worden. Die von ERNST angegebenen Hexa-, Septem- und Oktovalente wurden in diesem Material nicht gefunden oder als durch pyknotische Effekte entstandene Verbände aus den Zählungen ausgeschaltet.

Die angeführten Unsicherheiten in der Diakineseauswertung im Hinblick auf echte, durch Chiasmata zusammengehaltene Paarungsverbände lassen den Wert von Diakineseanalysen trotz kritischer Auswertung zweifelhaft erscheinen. Meta-Anaphase-I-Auswertungen bieten aber dann an Hand der koorientierten Verbände die Möglichkeit zu versuchen, die minimale Chiasmafrequenz aus der Valenz der Verbände zu erfassen.

Für die PMZ mit 8 Univalenten war es, abgesehen von bestimmten Sonderfällen, unmöglich zu entscheiden, ob die Meta- oder Anaphase I vorlag, so daß es zweckmäßig ist, mit TOMETORP (1939) und PERSON (1954) von einer Meta-Anaphase I zu sprechen. Die Entscheidung darüber, welches Stadium vorlag, war dagegen leicht, wenn neben den Univalenten Bivalente und höhere Chromosomenverbände auftraten.

An Zellen mit 8 Univalenten ist versucht worden zu entscheiden, ob deren Verteilung auf die beiden Pole zufallsgemäß erfolgt. Eine Auszählung ERNSTS (1940) an 100 PMZ ergab zufallsgemäße Verteilung bei einem  $\chi^2$  von 0,68 und einer Wahrscheinlichkeit von 98–99%. Die Überprüfung dieser Feststellung an 2356 PMZ (Tabelle 2) zeigte zwar, daß die beobachteten Zahlenverhältnisse der fünf Verteilungsmöglichkeiten

Tabelle 2. Verteilungsmöglichkeiten ganzer Univalente in der Meiose I

Verteilungstyp	Erwartete Häufigkeit	Gefundene Häufigkeit
	der Verteilungsklasse	
	b	a
0:8	14	6
1:7	116	139
2:6	405	342
3:5	810	761
4:4	1011	1108
	2356	2356

ten der 8 Chromosomen im großen ganzen den bei Zufallsverteilung theoretisch zu erwartenden Verhältnissen folgten, aber es ergab sich ein  $\chi^2$ -Wert von 31,2 und damit ein P-Wert von  $< 0,001$ ; eine rein zufallsgemäße Verteilung ließ sich also nicht sichern.

Eine derartige Verteilung der Univalente ist an sich auch nicht zu erwarten, und zwar aus folgenden Gründen: 1. Es war praktisch nicht möglich, den Verteilungstyp 8:0 mit Sicherheit zu erfassen, da in solchen Fällen meist unklar blieb, ob die anaphasische Verteilung der Univalente bereits erfolgt war, oder ob es sich um eine Metaphase handelte. 2. Auch bei den anderen Verteilungstypen war die Entscheidung nicht immer einfach, weil die Univalente bei *A. majus* (besonders in Zellen mit 8 Univalenten) allgemein die Tendenz zu einer mehr polaren Lage in 2 Gruppen hatten, wodurch es keineswegs immer eindeutig war, ob die Pollage das Ergebnis einer Anaphasebewegung war oder eine solche Bewegung ihren Abschluß noch nicht gefunden hatte. Im letzten Fall wären noch zahlenmäßige Verschiebungen zwischen den Polgruppen zu erwarten, da bei Vorliegen von ausschließlich oder teilweise univalenten Chromosomen die Anaphasebewegung nicht die Zelle als Ganzes betrifft, sondern für jedes Univalent in Abhängigkeit







von seiner Orientierung in der Spindel ein unabhängiges Ereignis darstellt (ÖSTERGREN 1951). 3. Ein weiterer Unsicherheitsfaktor dieser Auszählungen lag darin, daß sie zu einem Zeitpunkt des Kernteilungsablaufes erfolgen mußten, an dem nicht mehr auszuschließen war, ob nicht bereits die verteilten Partnerchromosomen von Paarungsverbänden nach deren Koorientierung in den Polgruppen enthalten waren. 4. Schließlich konnten noch Störungen der Zufallsverteilung durch die oben erwähnten Positionskorrelationen im Pachytän gepaart gewesener Chromosomen hinzukommen.

Infolge starker Spiralisation erschienen die Univalente in der Meta-Anaphase I rund oder gedrunken stabförmig und isopyknotisch, d. h. ohne erkennbare Primäreinschnürung. Danach ist mit ÖSTERGREN (1951) eine einseitige Lage des Centromerapparates anzunehmen, und die Wanderungsrichtung des Einzelunivalentes in der Spindel dürfte abhängig davon sein, auf welchen Spindelpol hin das Centromer gerichtet war.

Neben den PMZ mit 8 Univalenten trat in der in diesen Fällen klar festzulegenden Anaphase I eine große Zahl von Zellen mit wahrscheinlich durch Chiasmata zusammengehaltenen Paarungsverbänden auf. Es wurden Bivalente, Trivalente, Quadrivalente und Quinquevalente in verschiedenen Kombinationen untereinander und mit Univalenten gefunden. Tabelle 3 gibt Auskunft über die absoluten und Prozentzahlen, in denen von insgesamt 7669 ausgezählten PMZ solche mit 8 Univalenten und mit Paarungsverbänden verschiedener Wertigkeit auftraten. 42,34 % aller PMZ wiesen nur Univalente auf, 57,66 die verschiedenen Paarungskonfigurationen. 39,82 % aller Zellen enthielten 1 Bivalent. Aus Tabelle 4 geht hervor, daß von insgesamt 61352 Chromosomen aus 7669 PMZ 80,5 % als Univalente auftreten, 19,5 % in Verbänden.

Den von ERNST (1940) zuerst durchgeführten Auszählungen von 250 PMZ gegenüber (Spalte 2 der Tabelle 4) ergeben sich starke Unterschiede. Er fand, daß 32,35 % aller Chromosomen in Verbänden auftraten, 67,65 % als Univalente. Diese Unterschiede in den Auszählungsergebnissen sind sicher darauf zurückzuführen, daß unsere Zählungen nur koorientierte Verbände erfaßten und augenscheinlich durch Verklebungen entstandene Zweierverbände nach Möglichkeit ausgeschaltet wurden. Auszählungen vor Beginn der Anaphase und Abschluß der Koorientierung der Centromere sind in jedem Fall sehr unzuverlässig und nicht in der Lage, ein einigermaßen genaues Bild über den Anteil eventuell durch Chiasmata zusammengehaltener Paarungsverbände zu geben.

Will man die Paarungsverbände unter dem Aspekt der Chiasmabildung betrachten, darf nicht übersehen werden, daß in diesem Material zweifellos auch noch in diesem Stadium der Meiose z. T. achiasmatische Pseudoverbände vorlagen, die sich zwar in manchen Fällen ausschalten ließen, aber auf Grund morphologischer Übereinstimmung mit den bei Chiasmabildung zu erwartenden Paarungsverbänden keineswegs alle ausgeschaltet sein müssen.

Die Bivalente waren bis auf wenige Ausnahmen stabförmig, d. h. bei erfolgter Chiasmabildung waren die Chiasmata vollständig terminalisiert. Sehr viel seltener wurden Verbände gefunden, die Bivalenten mit interstitiellen oder subterminalen Chiasmata glichen. Neben den symmetrischen Chiasmata traten in einigen Bivalenten auch asymmetrische, laterale Chiasmata auf. Diese Lateralchiasmata würden bei Prophasepaarung ungleich langer Chromosomen als Austauschergebnis zwischen den beiden Partnern verständlich.

Die symmetrischen Chiasmata deuten an, daß die Pachytänpaarung in den meisten Fällen an den Enden der Paarungspartner oder in gleicher Entfernung von den Enden begonnen hat. In heteromorphen Bivalenten drücken sich die Größenunterschiede der Paarungspartner

Tabelle 4. Häufigkeit der verschiedenen Valenzstufen in der Anaphase I

Valenzstufe	Eigene Angaben in % bezogen auf Anzahl n = 61352 beobachteter Chromosomen	Angaben von ERNST in % bezogen auf Anzahl n = 2000 beobachteter Chromosomen
Univalente . . .	80,50	67,65
Bivalente . . .	18,10	25,30
Trivalente . . .	1,25	4,35
Quadrivalente . .	0,13	1,60
Quinquevalente .	0,02	1,10
Gesamt	100,00	100,00

aus. Daß in den meisten Fällen gleichmäßige Bivalente auftraten, die Partner also keine auffälligen Größenunterschiede aufwiesen, könnte als Anzeichen dafür gewertet werden, daß die Paarung im Pachytän nicht rein zufallsmäßig erfolgte.

Die Bivalente wurden alle in der Spindel koorientiert, und wo

mehr als 1 Bivalent in der PMZ auftrat, waren diese meist parallel angeordnet. PMZ mit 1, 2 bzw. 3 Bivalenten zeigen die Abb. 8—11. Die Spindel selbst war wie bei vielen Objekten mit univalenten Chromosomen in der ersten meiotischen Teilung meist wandständig und gebogen.

Die Trivalente traten in verschiedener Koorientierung auf, und zwar als Stabtrivalente und als Ringbivalente mit einem am Ring angehefteten Chromosom (Abb. 12). Während im ersten Fall minimal zwei Chiasmata Voraussetzung zur Entstehung des Verbandes sind, wären im 2. Fall mindestens drei notwendig. Meist waren die Stabtrivalente parallel zur Spindelachse (linear) orientiert (Abb. 13), seltener war ein Centromer auf einen, die beiden anderen auf den anderen Pol zu orientiert (Abb. 14). 3,2% aller PMZ enthielten Trivalente. In den meisten Fällen war auch hier die Terminalisation vollständig.

Meist kettenförmige (wahrscheinlich achiasmatische) Quadrivalente traten in 0,27%, Quinquevalente in 0,02% aller ausgewerteten PMZ auf. Höhere Chromosomenverbände, für die chiasmatische Bindungen angenommen werden könnten, wurden im Gegensatz zu ERNST (1940)

nicht gefunden. Fälle, in denen 7 oder alle 8 Chromosomen des haploiden Chromosomensatzes in einem Verband auftraten, waren wohl alle durch Verklebungen entstanden. Gegen die von ERNST in seiner Abb. 1 dargestellten Septem- und Oktovalente spricht allein schon ihre



Abb. 9

Abb. 10

Abb. 11

Abb. 9—11. Anaphase I. — Abb. 9 mit einem Bivalent. — Abb. 10 mit zwei Bivalenten. — Abb. 11 mit drei Bivalenten (1500 ×)

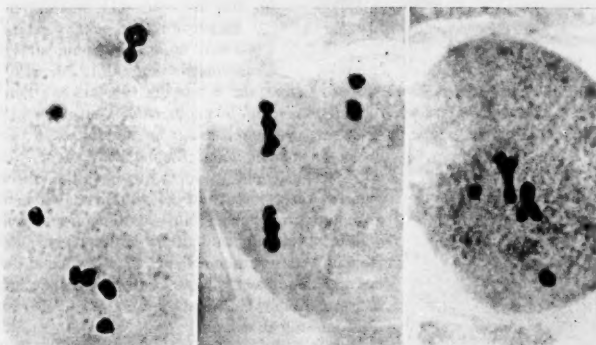


Abb. 12

Abb. 13

Abb. 14

Abb. 12—14. Trivalente. Abb. 12. Metaphase I mit einem Trivalent. Abb. 13. Anaphase I mit zwei linear koordinierten Trivalenten. Abb. 14. Anaphase I mit zwei konvergent koordinierten Trivalenten (1500 ×)

Form, die eine unwahrscheinlich große Anzahl von Chiasmata zu ihrer Entstehung erfordern würde. Träten derartige Multivalente auf, wären Kettenverbände zu erwarten. Statt dessen dürfte es sich in diesen Fällen um pyknotische Effekte handeln.

Eine Gegenüberstellung der Diakinese- und Anaphase-I-Konfigurationen nach ihrem zahlenmäßigen Auftreten für die Pflanze 540/23 (Tabelle 5) ergibt, daß der

Prozentsatz von 31,43 in der Diakinese als Verbände aufgetretener Chromosomen in der Anaphase I auf 17,36% abgesunken ist. Dies ist eine deutliche Bestätigung der Unsicherheit der Diakineseauswertungen, auf die bereits oben hingewiesen wurde.

ERNST (1940) gab für die frühe bis späte Anaphase I an, daß 32,35% aller Chromosomen in Verbänden auftraten. Dieser Wert entspricht etwa dem doppelten

Tabelle 5. Gegenüberstellung der Verbände in Diakinese und Anaphase I (Pflanze 540/23)

Konfiguration	Diakinese %	Anaphase %
8 I . . . . .	23,5	45,3
1 II + 6 I . . . . .	38,0	41,1
2 II + 4 I . . . . .	22,0	10,2
3 II + 2 I . . . . .	6,1	0,8
4 II . . . . .	1,2	0,3
1 III + 5 I . . . . .	3,9	1,5
1 III + 1 II + 3 I . . . . .	2,2	0,4
1 III + 2 II + 1 I . . . . .	0,5	—
2 III + 2 I . . . . .	0,2	0,1
1 IV + 4 I . . . . .	1,5	0,3
1 IV + 1 II + 2 I . . . . .	0,5	—
1 IV + 2 II . . . . .	0,2	—
Beobachtete Gesamtanzahl . .	100,0 406	100,0 723

von uns gefundenen Prozentsatz und dürfte seine Erklärung in mitgezählten Verklebungen finden, die in unserem Material nach Möglichkeit ausgeschaltet wurden. Keinesfalls entspricht der Wert in dieser Höhe den tatsächlichen Verhältnissen. Auch die von ERNST beobachteten Verteilungen ganzer Bivalente in der Anaphase I auf die Pole konnten nicht bestätigt werden. Die Bivalente erfuhren in fast allen Fällen ihre „Reduktion“ in der Anaphase I, d. h. die Paarungspartner wurden auf entgegengesetzte Pole verteilt. In seltenen Fällen blieb ein Bivalent auf Grund von Trennungsschwierigkeiten mit ausgespannter Brücke in der Äquatorialplatte liegen. Derartige Fälle ließen sich in der Metaphase II bestätigen.

ERNST gibt in seiner Arbeit für PMZ mit einem Bivalent und sechs Univalenten an, daß bei 100 der-

artigen Zellen 27% der Bivalente als Ganze auf einen Pol verteilt wurden, und für Zellen mit beliebiger anderer Konstitution bezüglich der Paarungsverbände soll der Prozentsatz sogar auf 52,49 gestiegen sein. Diese Angaben dürften

ihren Grund in einem Beobachtungsfehler haben, und zwar insofern, als wahrscheinlich Prometaphasen ausgewertet wurden, die in manchen Fällen durchaus das gleiche Bild wie die späte Anaphase I bieten, allerdings mit dem Unterschied, daß die Bivalentpartner noch nicht verteilt wurden, so daß bei angenäherter Pollage vor der Koorientierung der Eindruck einer Verteilung ganzer Bivalente auf die Pole entstehen kann.

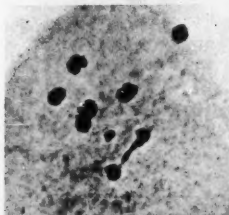


Abb. 15. Anaphase I mit einer Brücken-Bivalent-Fragment-Konfiguration (1500 ×)

In einer der untersuchten Pflanzen (554/5) wiesen bis zu 20% der PMZ in Anaphase I eine Bivalentbrücke mit Fragment auf (Abb. 15). Die Brückenkonfiguration glich genau den von diploiden Organismen her

bekannten und für Austausch in einer paracentrischen, heterozygoten Inversion charakteristischen Brückenkonfigurationen. Auch in den anderen haploiden Pflanzen traten, allerdings nur sporadisch, Brücken mit Fragment auf. Derartige Konfigurationen können bei Diploiden grundsätzlich auf zweierlei Weise erklärt werden: Einmal als

Ergebnis von Crossing-over in heterozygoten, parazentrischen Inversionen und zum anderen durch Brüche und Reunionen. Regelmäßiges Auftreten dieser Brücken und übereinstimmende Fragmentgröße ist als Hinweis auf die Existenz einer Inversionsbrücke zu werten. Weitere Kriterien, die Hinweise auf die Entstehungsweise der Brücke mit Fragment geben können, wurden von HAGA (1953) und von M. WALTERS (1950) zusammengestellt.

Bei der haploiden Pflanze mit regelmäßigem Auftreten der Bivalentbrücke und des Fragmentes läßt sich die Konfiguration auf dreierlei Weise erklären, wenn man von vornherein einen sporadisch zu erwartenden Bruch-Reunions-Mechanismus ausschaltet. Die Konfiguration könnte 1. durch Crossing-over in einer heterozygot invertierten Duplikation nach dem von diploiden Formen her bekannten Muster entstehen. Dabei ist die Schleifenpaarung im invertierten Bereich Voraussetzung, und die Duplikation müßte relativ groß sein, um einen derartigen Paarungstyp zu ermöglichen. 2. Zur Entstehung der gleichen Konfiguration wird Schleifenpaarung unnötig, wenn hinsichtlich ihrer Lage zum Centromer relativ invertierte, homologe Bereiche in den Paarungspartnern einmal rechts und einmal links vom jeweiligen Centromer liegen und die Paarung an einem Ende der Chromosomen oder der Duplikationen beginnt. Erfolgt Austausch zwischen den Paarungspartnern im Duplikationsbereich, entsteht auch hier eine Bivalentbrücke mit Fragment (Abb. 16). 3. Das gleiche Bild wäre auch ohne Annahme von Duplikationen zu erwarten, wenn Austausch zwischen gepaarten inhomologen Segmenten bei der für Fall 2 geschilderten Centromeranordnung eintreäte.

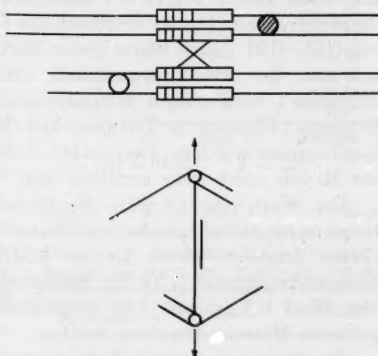


Abb. 16. Schematische Darstellung der vermutlichen Entstehungsweise der Brücken-Bivalent-Konfiguration mit Fragment

Möglichkeit 3 läßt sich als Erklärung der Konfiguration im vorliegenden Fall auf Grund des relativ regelmäßigen Auftretens der Konfigurationen in nur einer Pflanze wohl ohne großes Bedenken ausschalten. Außerdem wird der regelmäßige Austausch zwischen bestimmten inhomologen Bereichen der Paarungspartner durch die viel zu geringe Chiasmafrequenz, auf die gleich noch einzugehen sein wird, in seiner Wahrscheinlichkeit stark eingeschränkt.

Gegen die Erklärungsmöglichkeit 1 spricht, daß es nicht gelungen ist, im Pachytän der Pflanze 554/5 einwandfrei eine Schleifenpaarung nachzuweisen, so daß der Deutungsmöglichkeit 2 im vorliegenden Fall die größte Wahrscheinlichkeit zugeschrieben werden muß. Demnach wäre im Auftreten dieser Brückenkonfiguration mit Fragment ein Hinweis auf eine im haploiden Genom vorhandene Duplikation, Austausch in diesem Bereich und bevorzugte Paarung zweier bestimmter Chromosomen zu sehen.

Die Beschränkung der Konfiguration auf nur eine Pflanze würde ihren Grund in einem Strukturumbau (Inversion) des Chromosoms mit der Duplikation in

dieser Pflanze finden, gleichzeitig aber auch einen Hinweis dafür darstellen, daß auch in den anderen Pflanzen, bei denen eine derartige Konfiguration nicht gefunden wurde, die gleiche Duplikation vorliegen könnte, und ein Teil der Partner der Bivalente tatsächlich chiasmatisch gebunden ist.

Neben den Bivalentbrücken mit Fragment traten in der Anaphase I selten noch Brücken ohne Fragment auf, die entweder einfache Verklebungseffekte durch chromatische Agglutination darstellen oder durch reziproke Chromatidentranslokationen entstehen könnten.

Die durchschnittliche Bivalentanzahl aller ausgewerteten PMZ betrug nach Tabelle 3 0,72 bei einer Schwankung von 0,58—0,81. Die Chiasmafrequenz lag im Durchschnitt bei 0,8 je Zelle und schwankte von 0,61—0,91. Diese Werte stellen Minimalfrequenzen dar und ergeben sich aus der zum Zusammenhalt eines Paarungsverbandes bis zur Anaphase I notwendigen Minimalchiasmazahl. Das bedeutet, daß je Bivalent 1 Chiasma, je Trivalent und Quadivalent 2 bzw. 3 Chiasmata angenommen wurden. Der exakte Wert, der sich in diesem Stadium der Meiose nicht mehr ermitteln läßt, kann tatsächlich höher liegen.

Der Wert von 0,8 wäre die höchste bisher gefundene Chiasmafrequenz für Monohaploide, weicht aber erheblich von den nach ERNSTS (1940) Angaben durch LEVAN (1942) errechneten Durchschnitts-Chiasmafrequenzen (1,74 für Metaphase I, 1,41 für Anaphase I) ab. Der Wert 0,8 ist mit 1,41 vergleichbar und aus einem wesentlich größeren Material errechnet worden.

Die Chiasmafrequenz je Zelle wurde mit der Poisson-Verteilung verglichen. Dabei ergab sich für die ausgewertete Gesamtzellzahl bei einem  $\chi^2$  von 61,42 (Tabelle 6) keine Übereinstimmung zwischen Chiasma- und Poisson-Verteilung, d. h. die Chiasmata verteilten sich nicht zufallsgemäß über die gesamte gepaarte Chromosomenlänge des haploiden Chromosomensatzes. In beiden Fällen trat ein deutlicher Überschuß in der Klasse mit einem Chiasma, ein Defizit in allen anderen Klassen auf. Diese Ergebnisse decken sich z. T. mit den von LEVAN (1942) für haploiden Roggen gefundenen und deuten darauf hin, daß ein Chiasma zumindest besonders leicht und bevorzugt angelegt wird. Auch hierin dürfte unter Umständen ein Hinweis auf wenigstens eine größere Duplikation im haploiden Chromosomensatz zu sehen sein.

Unterteilt man die durchschnittliche Chiasmafrequenz (0,8) in zwei Fraktionen a und b, wobei a den Anteil der Chiasmata charakterisiert, der besonders leicht und vorzugsweise gebildet wird (Duplikation), und b den Rest, und setzt man dafür jeweils die durch Ausprobieren erhaltenen Frequenzen von 0,32 bzw. 0,48 ein, so ist es möglich, den  $\chi^2$ -Wert von 61,42 auf 4,246 zu drücken (Tabelle 7). In gleicher Weise und mit dem prinzipiell gleichen Ergebnis wurde von LEVAN (1942) verfahren. In unserem Fall läßt sich allerdings auch nach dieser Manipulation noch keine ganz ausreichende Sicherung der zufallsgemäßen

Anlage von 60% der gebildeten Chiasmata erreichen, obwohl der Verdacht einer solchen Anlage nach dem Ergebnis nahezu liegen scheint. Auf die Erklärungsmöglichkeiten einer annähernd zufallsgemäßen Anlage eines Teiles der Chiasmata wird in der Diskussion näher eingegangen.

Bisher ist immer von der Polverteilung ganzer Univalente in der Meta-Anaphase I die Rede gewesen („postdivision“ nach DARLINGTON 1937). Tatsächlich tritt dieser Verteilungstyp nicht immer auf, sondern ein bestimmter Prozentsatz der Univalente in den PMZ wird bereits in der ersten meiotischen Teilung geteilt und die Chromatiden auf die Pole verteilt, was naturgemäß erheblich zum unregelmäßigen Ablauf der Meiose II beiträgt. Im Einzelfall können alle oder nur ein Teil der Univalente einer PMZ diese vorzeitige Verteilung der Chromatiden („predivision“ im Sinne DARLINGTONS 1937) erfahren.

In 80,4% der 3442 ausgewerteten Zellen mit 8 Univalenten wurden diese als Ganze auf die Pole verteilt, in 16,9% der Zellen wurde ein Teil der Univalente in der Meiose I äquationell geteilt, in 94 Zellen (2,7%) wurden alle Univalente äquationell geteilt. Im letzten Fall nimmt die erste meiotische Teilung den Charakter einer reinen Mitose an; die zweite meiotische Teilung fällt aus.

In Zellen mit Paarungsverbänden sank der Anteil der „Äquationen“ auf 5,78% (Zellen mit einem Bivalent) ab, wobei allerdings nicht ausgeschlossen ist, daß hier der Anteil der „Äquationen“ tatsächlich höher ist als erfaßt, wenn noch Univalentteilungen einsetzen, nachdem die Bivalentpartner bereits die Pole erreicht hatten. In solchen Fällen wurde die betreffende Zelle den Zellen mit 8 Univalenten zugeschlagen. Die Auswertung der Zellen mit Paarungsverbänden (Tabelle 8) hinsichtlich der in Teilung befindlichen Univalente erfolgte zu einem Zeitpunkt, an dem die Paarungsverbände koorientiert waren, und sie kann

Tabelle 6. Vergleich der Chiasmaverteilung mit der Poisson-Verteilung

Anzahl der X'ta/Zelle	Häufigkeit	theoretisch
0	3247	3448,56
1	3053	2756,13
2	1074	1101,38
3	250	293,94
4	42	58,54
5	2	9,45
	7668	7668,00

$$\chi^2 = 61,42 \quad P < 10^{-3}$$

Tabelle 7. Vergleich der Chiasmaverteilung mit der Poisson-Verteilung nach Unterteilung der durchschnittlichen Chiasmahäufigkeit von 0,8 in  $a = 0,32$  und  $b = 0,48$

Anzahl der X'ta/Zelle	Häufigkeit	theoretisch
0	3247	3228,4
1	3053	3066,5
2	1074	1100,0
3	250	234,2
4	42	34,9
5	2	4,0
	7668	7668,0

$$\chi^2 = 4,246 \quad P = 0,5 - 0,6$$



damit nicht unbedingt als repräsentativ angesehen werden. Einen Hinweis dafür, daß häufig die Teilung der Univalente in Chromatiden in der Meiose I erst nach Verteilung der Bivalentpartner erfolgt, geben die Zellen, in denen durch Brückenbildung und die damit verbundene erschwerte Trennung der Paarungspartner ein Bivalent länger als Ganzes in der Spindel verbleibt. In diesen Fällen war oft ein erheblicher Teil oder alle neben dem Paarungsverband verbleibenden Univalente äquationell geteilt und verteilt worden. Insgesamt treten nach Tabelle 8 in 11,7% aller ausgewerteten PMZ Univalentteilungen in der Anaphase der ersten meiotischen Teilung ein.

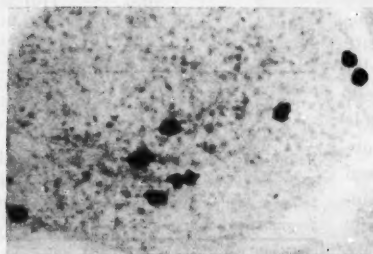


Abb. 17

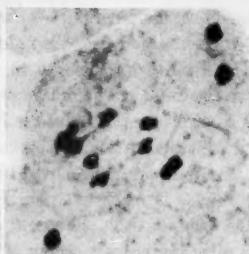


Abb. 18

Abb. 17 u. 18. Anaphase I mit in äquationeller Teilung befindlichen Univalenten. Abb. 17 mit vier sich teilenden Univalenten. — Abb. 18 mit fünf sich teilenden Univalenten; die sich trennenden Chromatiden sind noch durch eine dünne Fibrille im Centromerbereich miteinander verbunden (1500 ×)

Keinesfalls charakteristisch für die tatsächlichen Verhältnisse erscheinen die aus 48 ausgewerteten PMZ abgeleiteten Angaben von ERNST (1940), wonach nur 5–10% dieser Zellen die Verteilung ganzer Univalente aufwiesen und in 6,56% der Zellen alle 8 Univalente in der Meiose I geteilt wurden. Diese 6,56% entsprechen unseren 2,7%. Um eine fundierte Aussage über die Univalentäquationsverhältnisse zu machen, ist diese Zellzahl viel zu klein, zumal sich bezüglich der Äquation innerhalb eines Präparates sehr variable Verhältnisse ergeben und die Äquationen als Ausdruck der zeitlichen Asynchronie des Meioseablaufes bei haploiden Formen oft strich- oder nesterweise auftreten, in anderen Fällen aber über den ganzen Loculus verteilt sind.

Auffällig und typisch war, daß in jedem Falle, in dem Univalente bereits in der ersten meiotischen Teilung äquationell geteilt wurden, die Chromatiden durch einen feinen Strang verbunden waren, der zu einer langen Brücke zwischen den Polen ausgedehnt werden konnte, ohne die Chromatiden an ihrer endgültigen Verteilung auf entgegengesetzte Pole zu hindern (Abb. 17, 18).



Tabelle 8. Anteil der äquationellen Univalentteilungen in der Meiose I für PMZ mit der Konstitution 8 I, 1 II + 6 I und 2 II + 4 I

Pflanzen-Nr.	Chromatiden Univalente Bivalente	— + —	+ + —	+ + —	— + 1	+ + 1	— + 2	+ + 2
540/23		291	33	3	285	12	72	2
540/23		317	61	2	265	23	57	—
554/5		380	80	22	589	30	130	4
554/5		239	109	19	310	40	127	7
554/5		555	79	7	595	17	185	—
554/5		187	12	—	206	3	81	—
557/15		298	33	—	285	8	52	—
557/15		336	93	11	356	24	123	3
566/18		162	83	30	191	32	51	3
Insgesamt		2765	583	94	3082	189	878	19
%		80,4	16,9	2,7	94,2	5,8	97,9	2,1

ÖSTERGREN (1951) versuchte die Brücken auf eine „Teilungsunreife“ des Centromers zurückzuführen und vermutete einen festen Kontakt der Schwesterchromatiden in der Mittelregion des Centromerapparates (LIMA DE FARIA 1949, 1950; TJIO und LEVAN 1950). Unter dem Einfluß der Zugwirkung der Spindelfasern könnte diese zwischen den „Kinetomeren“ gelegene Centromerregion zu einer Brücke gedehnt werden.

Nach Untersuchungen von LIMA DE FARIA (1955) an *Tradescantia virginiana*, *T. bracteata* und *Secale cereale* ist der Centromerbereich in der Anaphase I der Meiose bereits geteilt, und der Zusammenhalt der Schwesterchromatiden erfolgt in den proximalen Abschnitten durch eine lokalisierte Matrixwirkung. Für die Univalente bei haploiden Formen von *A. majus* ist es zu diesem Zeitpunkt des chromosomalen Formwechsels unmöglich zu entscheiden, ob der Centromerbereich bereits „geteilt“ ist oder nicht. Ist er bereits geteilt, wäre an sich eine zwischen den Chromatiden ausgespannte Doppelfibrille zu erwarten, die in einigen wenigen Fällen auch gefunden wurde. Unter der Voraussetzung, daß der Zusammenhalt der Univalentchromatiden bei geteiltem Centromer in den proximalen Abschnitten erfolgt, müßte dann die Einzelbrücke als Fusionsprodukt einer Doppelbrücke unter dem Spindelzug erklärt werden. Andererseits könnten die Doppelbrücken auch das Ergebnis einer Centromermitteilung, d. h. eines Querbruches des Centromers bei Kontakt im Mittelsegment des Centromerapparates sein.

Bemerkenswert war in vielen Fällen äquationeller Univalentteilung in der Anaphase I, daß ein Teil oder alle durch die eben geschilderten Fibrillen noch verbundenen Chromatiden mit ihren Enden auf die Pole zu orientiert waren (Abb. 18). Da potentiell alle sich teilenden Univalente zu dieser Orientierung ihrer Chromatidenenden befähigt erscheinen, dürfte es sich nicht um eine Neo-Centromerenaktivität im

Sinne von KATTERMANN (1939), RHOADES (1952), WALTERS (1952) und BOSEMARK (1956) handeln. Es wird vielmehr angenommen, daß diese Orientierung der Schenkelenden unter dem Einfluß der Spindelstreckung, der Plasmaströmung oder des  $\gamma$ -Faktors von ÖSTERGREN (1951) zustande kommt, und zwar besonders dann, wenn die Abspiralisierung in der späten Anaphase I schon fortgeschritten ist.

Während DARLINGTON (1932, 1937) die Ursache der Univalententeilung in einer zufälligen Lage der Univalente in Äquatornähe sieht, erklärt ÖSTERGREN (1951) den gleichen Vorgang durch unterschiedliche Anheftung der Spindelfasern an dem einseitig in den isopyknotischen Meioseunivalenten lokalisierten Centromerapparat. Die Verteilung



Abb. 19. Acht Univalente in der Meta-Anaphase I. Ein Univalent mit angeheftetem Fragment (1500  $\times$ )

ganzer Univalente erfolgt nach dieser Auffassung, wenn das Centromer in der Anaphase I einem Pol zugekehrt ist, die Teilung der Univalente bei Anheftung von Spindelfasern beider Pole im Centromerbereich. Im letzten Fall gelangt das Univalent durch Zugwirkung von beiden Polen, die mit der Entfernung vom Pol stärker werden, in den Zelläquator, erreicht dort eine Gleichgewichtslage und wird dann durch die gleichen Kräfte, die zur äquatorialen Einordnung führen, geteilt. Dabei treten die zwischen den Chroma-

tiden ausgespannten Fibrillen auf. Je nach der Anheftungsweise der Spindelfasern beider Pole an den Kinetomeren tritt normale Längsteilung oder Mißteilung des Centromerbereiches ein.

Neben den normalen Univalenten traten in der Anaphase I wiederholt Univalente mit einem angehefteten, stets etwa gleich großen Fragment auf (Abb. 19). Diese angehefteten Fragmente könnten das Ergebnis von Chromosomenbrüchen sein oder nach Austauschvorgängen innerhalb des duplizierten Bereiches von ringförmig in-sich-gepaarten Univalenten (Abb. 6, 7) in der in der Abb. 20 schematisch dargestellten Weise entstehen. Weiterhin könnten sie theoretisch auch nach Austausch zwischen inhomologen Segmenten in-sich-gepaarter Univalente oder nach Austausch in „fold backs“ kleinerer Segmente eines in anderen Bereichen mit einem Paarungspartner paarenden Chromosoms, das mit diesem Partner keinen Austausch einging, gebildet werden (Abb. 21). Der Zusammenhalt von Chromosomenrestkörper und Fragment könnte durch die Matrix vermittelt werden. Die Tatsache, daß die angehefteten Fragmente in fast allen Fällen von der gleichen Größenordnung waren, scheint für einen Austausch zwischen duplizierten Bereichen eines ringförmig in-sich-gepaarten Univalents zu sprechen.

Abgesehen von den Zellen, deren 8 Univalente in der Anaphase I äquationell geteilt wurden und für die die zweite meiotische Teilung ausfiel (Dyadenbildung), traten die PMZ, nachdem die Chromosomen die Pollage erreicht hatten, in die Interkinese ein. Es erfolgte eine partielle Abspiralisierung. Die Chromatiden blieben im Bereich der

Centromerregion zusammenhängen, während die Enden abspreizten, so daß ganze Chromosomen typisch kreuzförmig erschienen. Wurden in der Anaphase I Chromatiden auf die Pole verteilt, so traten diese in der Interkinese als dünne einsträngige Strukturen auf.

In der Anaphase I wurden wiederholt Hinweise dafür gefunden, daß eine im einzelnen unterschiedlich große Anzahl von Chromosomen aus der Spindel ausgeschlossen wurde und in der Zelle liegen blieb, ohne verteilt zu werden.

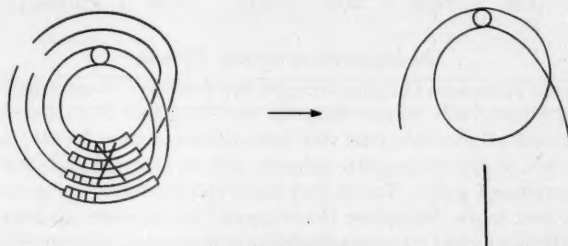


Abb. 20

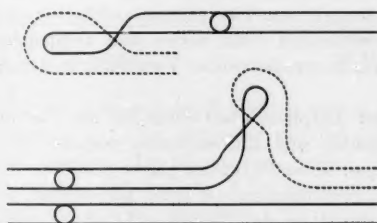


Abb. 21

Abb. 20 u. 21. Schematische Darstellung verschiedener Entstehungsmöglichkeiten eines angehefteten Fragmentes (nähere Erläuterung im Text)

Für haploide Formen von *Godetia* wurde von HAKANSSON (1940) die Degeneration aus der Spindel ausgeschlossener Chromosomen wahrscheinlich gemacht. Bei *Antirrhinum* erfolgte keine Degeneration.

Über den Anteil der Spindelausschlüsse orientieren die in Tabelle 9 zusammengefaßten Auszählungen der Anzahl von Chromosomengruppen je PMZ in der Interkinese. PMZ mit nur einer Chromosomengruppe als Ergebnis von 0:8-Verteilungen oder Restitutionskernbildung traten in 1,16% der Fälle auf. PMZ mit 2 Interkinesegruppen machten 74,59% der ausgewerteten Gesamtzellzahl aus. Zellen mit drei (22,05%) oder mehr Chromosomengruppen (2,2%) sind das Ergebnis von Spindelausschlüssen, schließen aber gleichzeitig im Äquatorialbereich zurückgebliebene Chromosomen („lagging“) ein, die allerdings nur für die

Entstehung eines sehr geringen Anteiles der PMZ mit drei oder mehr Chromosomengruppen verantwortlich zu machen sind.

Tabelle 9. Anzahl der Chromosomengruppen in der Interkinese

Zahl der Chromosomengruppen					Insgesamt
1	2	3	4	5	
19	1218	360	35	1	1633
1,16	74,59	22,05	2,14	0,06	100%

*b) Die zweite meiotische Teilung*

In der Metaphase II traten, wie sich aus den Interkineseverhältnissen bereits ablesen läßt, in der Mehrzahl der Fälle zwei Metaphaseplatten je PMZ auf, seltener drei oder vier, ganz selten nur eine. In der Chromosomenzahl je Metaphaseplatte spiegeln sich die Verteilungsverhältnisse der Anaphase I wider. Traten dort keine Teilungen der Univalente auf, waren auch in der Metaphase II nur ganze Chromosomen zu finden, die nun allerdings nicht mehr isopyknotisch waren, sondern in vielen Fällen eine  $\pm$  deutliche Einschnürung aufwiesen. Waren in der Anaphase I äquationelle Teilungen von Univalenten erfolgt, traten in der Metaphase II der betreffenden PMZ neben den Doppelchromatiden noch Einzelchromatiden in symmetrischer Verteilung in den Anaphaseplatten auf.

Wurden in der Anaphase I auf einen Pol nur Chromatiden, auf den anderen Chromatiden und Chromosomen verteilt, so wurde von der Chromatidengruppe keine Metaphaseplatte gebildet. Spindelwirkungen waren für die Chromatidengruppe nicht feststellbar, und die Chromatiden schienen direkt in die Telophase II überzugehen. Die andere Gruppe mit Chromosomen und Chromatiden bildete eine Metaphaseplatte, in die die Chromatiden nicht exakt eingeordnet wurden. Die Chromosomen teilten sich in der Anaphase II, die Tochterchromosomen als Teilungsprodukte wurden auf die Pole verteilt, und die zusätzlich vorhandenen Einzelchromatiden wurden entweder willkürlich in die als Ergebnis der abgelaufenen Anaphase II entstandenen Chromosomengruppen eingeschlossen, oder blieben zwischen diesen im Äquator liegen und bildeten später Kleinkerne.

Die Auswertung von 414 PMZ mit 2 Metaphaseplatten in der Metaphase II ergab die in der Tabelle 10 zusammengestellten Chromosomenverhältnisse. In 63,29% aller ausgewerteten PMZ wurden nur Doppelchromatiden und in 36,71% durch Univalententeilungen in der Meiose I entstandene Einzelchromatiden in den Metaphaseplatten gefunden. Aus Tabelle 8 ergab sich für die Anaphase I, daß im Durchschnitt aller ausgewerteten PMZ etwa 11,7% äquationell geteilte Univalente auf-

wiesen. Der Vergleich dieses Wertes mit den in der Metaphase II ermittelten 36,71 %, in denen Fälle reiner Äquation (Teilung aller Univalente in der Anaphase I) nicht mit enthalten sind, zeigt deutlich, daß Univalentteilungen auch noch sehr spät in der Anaphase I erfolgen konnten. Der für die Anaphase I gefundene Wert (11,7 %), der allerdings auf ein erheblich größeres Material zurückgeht, dürfte deshalb noch etwas zu niedrig liegen. Auf keinen Fall machen aber PMZ mit Univalentteilungen im Durchschnitt 90—95 % aller PMZ aus, wie ERNST (1940) angab.

Tabelle 10. *Metaphase-II-Konfiguration*

Konfiguration	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Platte I { Doppel-Chromatiden	4	5	6	7	8	7	6	6	5	5	4	4	4	3	3	3	2
	0	0	0	0	0	1	2	1	2	1	1	2	3	2	3	4	4
Platte II { Doppel-Chromatiden	4	3	2	1	0	0	0	1	1	2	3	2	1	3	2	1	2
	0	0	0	0	0	1	2	1	2	1	1	2	3	2	3	4	4
Anzahl der Einheiten .	8	8	8	8	8	9	10	9	10	9	9	10	11	10	11	12	12
Anzahl der Fälle . . .	95	92	51	18	6	2	1	11	6	27	51	21	1	22	7	2	1
Gesamtanzahl	262						152										
%	63,29						36,71										

Bei Bildung von zwei Metaphase-II-Platten traten auch zwei normale Anaphasespindeln auf, die entweder parallel oder im rechten Winkel zueinander standen. Im allgemeinen verlief die Anaphase II normal, und die Anzahl der auf die 4 Telophasegruppen verteilten Chromosomen ergab sich aus der Anaphase-I-Verteilung.

Waren in der Anaphase II Einzelchromatiden bereits in der Anaphase I geteilter Univalente vorhanden, so führten diese zu Chromosomenzahlenunterschieden zwischen den beiden Anaphasegruppen einer Spindel, wenn sie in die eine oder andere oder ungleichmäßig in beide eingeschlossen wurden. Wurden die Anaphase-I-Chromatiden keiner Anaphase-II-Tochtergruppe zugeteilt, sondern blieben zwischen ihnen liegen („lagging“), war die Möglichkeit zur Entstehung von zusätzlichen Kleinkernen oder Restitutionskernbildungen gegeben. Diese Restitutionskernbildung dürfte einen Grund für den hohen Triadenanteil nach der Telophase II darstellen. In manchen Fällen zeichneten sich die Chromosomen der Metaphase-II-Gruppen durch eine Asynchrone bezüglich des Anaphasebeginns aus.

Traten in der Metaphase II auf Grund von Spindelausschluß einzelner Chromosomen in der Anaphase I drei oder mehr Chromosomengruppen auf, wurden im allgemeinen auch drei oder mehr Spindeln

gebildet. Potentiell schien in der Anaphase II jede Doppelchromatide zur Spindelanlage befähigt zu sein. Hinweise auf tri- und multipolare Spindeln wurden nicht gefunden.

Anaphase-II-Brücken, fast immer ohne Fragment, waren nicht selten. Zum Teil dürfte es sich dabei um reine Verklebungsbrücken gehandelt haben. Die seltenen Anaphase-II-Brücken mit Fragment könnten auf einen Bruch-Reunionsmechanismus zurückzuführen sein oder nach In-Sich-Paarung eines Chromosoms mit Austausch dann entstehen, wenn durch Crossing-over ein dizentrischer Ring gebildet wurde, der in Anaphase I als ganze Einheit verteilt in Anaphase II zur Brückenbildung Anlaß geben dürfte.

Tabelle 11  
Kernzahl in Telophase II

Kernzahl	%
1	0,4
2	2,9
3	12,7
4	54,6
5	15,0
6	11,7
7	1,8
8	0,9
Insgesamt	100,0

In der Anaphase II gefundene Centromer-mißeilungen sind dann zu erwarten, wenn an den beiden Kinetomeren einer Einzelchromatide Spindelfasern entgegengesetzter Pole angreifen und durch ihre Zugwirkung einen Querbruch der Centromerregion herbeiführen. Dabei entstehen aus der Chromatide zwei telozentrische Chromatidenhälften, die den beiden Schenkeln entsprechen. PMZ mit Mißeilung in Anaphase II wiesen statt 16 Chromatiden nur 15 und zwei Chromatidenhälften, d. h. 17 Einheiten, auf.

Durch einfache oder doppelte Restitutionskernbildung in der zweiten meiotischen Teilung, überzählige Metaphaseplatten, in der Äquatorialebene zurückbleibende Chromatiden und eine Fülle anderer Abnormalitäten, die meist nicht näher zu klassifizieren waren, wurden die Kernzahlen in der Telophase II sehr vielgestaltig. In der Tabelle 11 sind die Auszählungen der Kernzahlen von 1000 PMZ in der Telophase II zusammengestellt. Die Kerngröße der späten Telophase II schwankte in Abhängigkeit von der Anzahl der im jeweiligen Kern eingeschlossenen Chromosomen sehr stark.

Die im Rahmen dieser Auszählung gefundenen 2,9% PMZ mit zwei Kernen decken sich anteilmäßig mit den vollständigen Äquationen in der Anaphase I (Tabelle 8). Allerdings sind beide Werte nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, da unter die zweikernigen PMZ in Telophase II auch solche fallen, die aus 0:8-Verteilungen in der Anaphase I oder aus doppelter Restitutionskernbildung in der Anaphase II hervorgingen.

In der Tabelle 12 ist das Typenverhältnis der nach Zellwandbildung aus den Telophase-II-Gonotokonten entstandenen Sporaden zusammengestellt. Die Mikrosporenzahl der 6000 ausgewerteten Sporaden variierte

von 1—8. Mehr als 8 Mikrosporen je Spore wurden ganz vereinzelt gefunden. Die Mikrosporengößen schwankten ebenso wie die Telophase-Kerngrößen sehr stark von winzigen Mikrocyten bis zu den sehr großen Einzelmikrosporen der Monaden.

Den in der Tabelle 11 zusammengestellten Kernzahlen in der Telophase I gegenüber weichen die prozentualen Anteile der einzelnen Sporadenklassen erheblich ab. Besonders der Anteil der Dyaden und Triaden ist sehr stark erhöht, während die Pentaden, Hexaden und Heptaden anteilmäßig abgesunken sind. Diese Differenzen finden ihre Erklärung in fehlenden Zellteilungen der PMZ, in deren Verlauf zwei-, drei- und selten auch vierkernige Mikrosporen entstehen.

Die Monaden kommen durch Restitutionskernbildungen entweder in beiden meiotischen Teilungen oder nach 0:8-Verteilung der Chromosomen in der Anaphase I durch Restitutionskernbildung in Anaphase II zustande.

Für die anderen Sporadenklassen, die keine Tetraden darstellen, kommen außer den fehlgegangenen Zellteilungen mit der Bildung von mehrkernigen Mikrosporen die folgenden Entstehungsmöglichkeiten in Frage:

1. Dyaden: a) vollständige Äquation in der Anaphase I und Ausfall der Meiose II; b) 0:8-Verteilung der Univalente in der Anaphase I und normaler Verlauf der Meiose II; c) Restitutionskernbildung in der Anaphase I und normaler Verlauf der Meiose II; d) doppelte Restitutionskernbildung in Anaphase II.

In den ersten 3 Fällen besitzen die Mikrosporen im allgemeinen den vollständigen haploiden Chromosomensatz, im letzten Fall können die Chromosomenzahlen der beiden Kerne in Abhängigkeit vom Verteilungstyp der Anaphase I stark unterschiedlich sein.

2. Triaden: a) partielle Äquation in Anaphase I und Verteilung von Einzelchromatiden auf einen, von Doppel- und Einzelchromatiden auf den anderen Pol. Die Chromosomengruppe mit Doppelchromatiden macht die Anaphase II durch; b) Restitutionskernbildung in einer der beiden Spindeln einer PMZ in der Meiose II.

3. Pentaden: Entstehung durch Kleinkern- und Mikrocytenbildung nach einer normalen weispindeligen Anaphase II.

4. Hexaden: a) drei Spindeln in der Anaphase II, wenn nach Spindel-ausschluß von Chromosomen in der Anaphase I in Metaphase II drei Metaphaseplatten auftreten; b) Kleinkern- und Mikrocytenbildung bei Anlage von zwei Spindeln.

Tabelle 12  
*Sporadentypen bei haploidem Antirrhinum majus*

Typ	%
Monaden	0,57
Dyaden	16,53
Triaden	22,89
Tetraden	52,93
Pentaden	5,85
Hexaden	1,18
Heptaden	0,05
Insgesamt	100,00



5. Heptaden: Entstehung wie Hexaden, aber mit zusätzlicher Kleinkernbildung.

6. Oktaden: a) vier Chromosomengruppen in Metaphase II und Anlage von vier Spindeln; b) entsprechend weniger Spindeln und Chromosomengruppen, aber Kleinkernbildung nicht in die Anaphasegruppen einbezogener Chromatiden.

Die diploiden oder tetraploiden Mikrosporen der Monaden und die unter 1a—c aufgeführten Mikrosporen der Dyaden sollten wenigstens teilweise funktionsfähig sein. Tatsächlich brachten aber Selbstungen der haploiden Pflanzen trotz ausgedehnter Versuche keinen Ansatz. Die Verwendung der haploiden Formen als weiblicher Kreuzungselter und die Kreuzung mit Pflanzen der diploiden Sippe 50 führte in wenigen Fällen zu einigen Nachkommen, die sich als diploid und in einigen Fällen als trisom erwiesen.

In allen untersuchten haploiden Pflanzen wurden sowohl diploide wie zweikernige PMZ, als auch PMZ mit unregelmäßigen, chromosomalen Zahlenabweichungen gefunden, über die in einer anderen Arbeit berichtet werden soll.

#### IV. Diskussion

##### a) Die prophasische Intrahaploidpaarung

Wenn DARLINGTON noch 1937 schreiben konnte, daß die einzige Form der Assoziation zwischen nichthomologen Chromosomensegmenten in der Verbindung der Chromosomenenden besteht, so ist diese These heute nach der gründlichen Untersuchung der meiotischen Prophase einer Reihe von haploiden Formen nicht mehr als absolut gültig zu betrachten. Derartige Endverbindungen, auf die sich DARLINGTON bezieht, wurden unter anderem für die Schildlaus *Icerya* (HUGHES-SCHRADER 1927) und haploide Formen von *Triticum monococcum* (KIHARA und KATAYAMA 1933; CHIZAKI 1934) beschrieben und wurden bis zur frühen Metaphase gelöst.

KOSTOFF (1938) sah in diesen von ihm als „Junktionen“ bezeichneten Verbindungen keine Beziehungen zu Paarungsvorgängen im Pachytän. Im Gegensatz dazu erscheint es heute gerechtfertigt, die Ursache dieser auch bei haploiden Formen von *Antirrhinum* auftretenden interchromosomalen Verbindungen in einer im Pachytän erfolgten inhomologen Paarung zu vermuten. Wahrscheinlich entstehen sie durch die gemeinsame Matrixbeladung der Paarungspartner, zwischen denen keine Austauschvorgänge erfolgten und damit auch keine Chiasmata angelegt wurden, und könnten deshalb als ein Hinweis auf Paarungen inhomologer Chromosomen des haploiden Chromosomensatzes auch bei den Objekten gewertet werden, wo derartige Paarungen in der frühen Prophase nicht unmittelbar zu verfolgen waren.

Nach vorläufigen Ergebnissen scheint diese prophasische Inhomologenpaarung bei *Antirrhinum* nicht auf die haploiden Formen be-



schränkt zu sein, da auch in trisomen Formen, die jetzt näher auf ihr Paarungsverhalten hin untersucht werden, Paarungen inhomologer Segmente bei der Trivalentbildung im Pachytän einzutreten scheinen.

Diese an *Antirrhinum majus* und den anderen in der Einleitung genannten Objekten gefundenen Paarungsverhältnisse machen es erforderlich, die These der ausschließlichen Paarung homologer Chromosomen und Chromosomensegmente stark einzuschränken. Statt dessen dürfte es sich darum handeln, daß die Paarung mit einer Differentialaffinität gekoppelt ist. In diploiden Formen, in denen jeweils zwei identische Paarungspartner vorliegen, sind die Paarungsvorgänge ganz spezifisch in ihrer Richtung und erfolgen ausschließlich zwischen den homologen Chromosomen. Bei haploiden Formen kann die Inhomologenpaarung bei einer allgemeinen Paarungstendenz unbekannter Ursache in der frühen meiotischen Prophase ersetzt bzw. erweitert werden durch Paarungsvorgänge zwischen nichthomologen oder nur partiell homologen Chromosomen, wobei sich dieser Paarungstyp seinem Wesen nach nicht grundsätzlich von der Paarung echt homologer Chromosomen zu unterscheiden scheint.

Die nachgewiesene Tatsache dieser Inhomologenpaarung soll aber nicht darüber hinwegtäuschen, daß besonders bei vielen diploiden Objekten kleine Inhomologien in den Paarungspartnern als Paarungslücken auftreten, d. h. die inhomologen Segmente in diesen Fällen nicht paaren bzw. sich sogar abzustößen scheinen. Andererseits ist es aber auch unbegründet, auf Grund gelegentlichen Nichtpaarens inhomologer Segmente rückzuschließen, daß es keine Paarung inhomologer Chromosomen oder Chromosomenabschnitte gibt.

Ob sich haploide Formen verschiedener Objekte bezüglich ihres Paarungsverhaltens unterschiedlich verhalten, ist fraglich. Es ist zwar für einige Objekte (z. B. von LINDSTROM und KOOS 1931 für die Tomate, von KOSTOFF 1942 für *Nicotiana Langsdorffii* und *N. rustica*) angegeben worden, daß in der meiotischen Prophase keine Paarung der Chromosomen erfolgt; es erscheint aber durchaus im Bereich des Möglichen zu liegen, daß eine Nachuntersuchung, besonders der frühen und mittleren Prophase, auch für diese Objekte Inhomologenpaarung nachweist. Das Fehlen von Bivalenten in der Diakinese und Meta-Anaphase I kann jedenfalls nicht als gültiges Kriterium zum Entscheid, ob im Pachytän Paarungen zwischen Inhomologen erfolgen oder nicht, angesehen werden, sondern würde höchstens die Aussage erlauben, daß kein Austausch und damit keine Chiasmabildung und außerdem auch keine Pseudoverbindungen nichtchiasmatischer Natur eintraten.

Obwohl sich im Pachytän der haploiden Formen von *A. majus* keine unmittelbaren Hinweise auf Duplikationen innerhalb des Chromosomensatzes finden ließen, ließ sich die Existenz mindestens einer interchromosomalen Duplikation aus der Brücken-Bivalent-Fragment-Konfiguration in der Anaphase I erschließen. Die Paarungsvorgänge zwischen inhomologen Chromosomen sind aber zweifellos nicht unbedingt an die Gegenwart von Duplikationen in den beiden jeweiligen Paarungspartnern gebunden. Wenn Duplikationen auch mit Sicherheit — dafür

spricht die Häufigkeit der Brücken-Bivalent-Konfiguration — zur bevorzugten Paarung bestimmter Chromosomen Anlaß geben, so deuten die „fold backs“, die in In-Sich-Paarungen ganzer Chromosomen und das hohe Ausmaß der Paarungen im Pachytän darauf hin, daß das Einsetzen der Paarung nicht an begrenzte Homologien geknüpft ist. Das bedeutet, daß Paarungen zwischen nichthomologen Chromosomen unter bestimmten Bedingungen grundsätzlich möglich sind, die Paarungsvorgänge selbst aber durch vorhandene Duplikationen innerhalb des haploiden Chromosomensatzes ein spezifisches Moment erhalten können.

Um die Kausalität der Paarung der Chromosomen in der meiotischen Prophase zu erklären, sind mehrere Hypothesen entwickelt worden. Die Vorstellungen FRIEDRICH-FREKSAS (1940) basieren auf der Annahme von Dipolmomenten. Die DNS ist nach dieser Hypothese an bestimmten Orten (Chromomeren) der kontinuierlichen Proteinstruktur der Chromosomen lokalisiert oder dort zumindest stärker konzentriert. Dabei sollen quer zur Längsachse der Chromosomen Dipolmomente auftreten und die Dipole aus unbekannten Gründen parallel zueinander zu liegen kommen. Die Dipolkkräfte sollen die Paarung homologer Chromosomen mit gleicher Ladungsverteilung vermitteln.

SERRA (1947) sieht die Ursache der Paarung in einer relativen DNS-Verarmung in der meiotischen Prophase. Auf Grund einer Dorsiventralität der Chromosomen in diesem Meiosestadium soll eine ungleichmäßige Beladung mit peripherem Nukleoprotein erfolgen und damit gleichzeitig eine seitenweise ungleiche Ladung der Stränge manifest werden, die die Anziehung zweier homologer Chromosomen hervorgerufen soll. Der Vorteil der Hypothese SERRAS liegt darin, daß hier die Ladungsverteilung am Chromosom leichter erklärbar wird. Nach beiden Hypothesen wäre eine, wenn auch schwächere Paarungstendenz inhomologer Chromosomen im Vergleich mit exakt homologen Chromosomen zu erwarten. Das angebliche Fehlen dieser Inhomologenpaarungen veranlaßte SERRA (1955), die Gültigkeit der Hypothese FRIEDRICH-FREKSAS zu bezweifeln oder zumindest einzuschränken und für seine Hypothese noch komplizierte, nicht unbedingt gerechtfertigt erscheinende Zusatzannahmen zu machen. Er kommt zu der Vorstellung, daß längs der Chromosomen sich in Form, Größe und Aufeinanderfolge unterscheidende flexible, achromatische Fibrillen oder Schleifen befinden, die die strukturelle Basis der Paarung darstellen und vor allem für die Spezifität der Paarung verantwortlich sein sollen. Eine Verschmelzung als Voraussetzung einer engen Kontaktpaarung soll nur unter gleichen Fibrillen der homologen Partnerchromosomen eintreten können.

Diese Annahme fällt in den Bereich der reinen Spekulation und scheint in ihrer Gültigkeit durch das Ausmaß der bei verschiedenen Objekten festgestellten Inhomologenpaarung zumindest sehr zweifelhaft zu sein.

Zusammenfassend ergibt sich, daß die These der ausschließlichen Paarung nur homologer Chromosomen bzw. Chromosomenstrukturelemente (Chromomeren) eingeschränkt werden muß, während die Feststellung der Paarung von stets nur 2 Einheiten an einem Punkt (NEWTON und DARLINGTON 1929) gültig bleibt und auch bei Inhomologenpaarung nicht durchbrochen wird.

b) *Die Chiasmabildung und die Natur der in Meta-Anaphase I auftretenden Paarungsverbände bei Antirrhinum majus*

Wenn sich die Paarung inhomologer Chromosomen bei haploiden Formen von *A. majus* rein morphologisch auch nicht grundsätzlich von homologen Paarungen zu unterscheiden scheint, so ergeben sich vom Gesichtspunkt der Chiasmabildung her Unterschiede zwischen den beiden Paarungsmodi, da eine Chiasmaanlage zwischen gepaarten inhomologen Segmenten, wenn überhaupt, nur in sehr begrenztem Umfang eintritt.

Aus der Anzahl der je PMZ aufgetretenen Paarungsverbände ist im experimentellen Teil der Arbeit, ausgehend von der Voraussetzung, daß die zur Auswertung herangezogenen Paarungsverbände chiasmatisch gebunden waren und unter bewußter Beiseitlassung anderer Erklärungsmöglichkeiten der Verbände, eine durchschnittliche Chiasmafrequenz von 0,8 je Zelle ermittelt worden. Es erhebt sich nun die Frage, inwieweit diese Verfahrensweise gerechtfertigt war und worin sie ihre Stützen findet, da es grundsätzlich mehrere Möglichkeiten zur Deutung der aufgetretenen Paarungsverbände gibt:

1. Es könnte sich tatsächlich um chiasmatisch gebundene Verbände handeln;

2. es könnte sich in allen oder in einem Teil der Fälle um durch Verklebung entstandene Pseudoverbände handeln, welche in ihrem Meta-Anaphase-I-Verhalten echten chiasmatisch gebundenen Paarungsverbänden gleichen.

Im Falle der ersten Deutungsmöglichkeit erhebt sich die weitere Frage, ob die Chiasmabildung ausschließlich zwischen homologen oder inhomologen Segmenten oder zu einem Teil in diesen und jenen erfolgt.

Für die chiasmatische Bindung der Paarungspartner der Bi- und Multivalente sprach einmal ihre Form, die den Paarungsverbänden diploider und triploider bzw. trisomer Formen entsprach. Diese morphologische Übereinstimmung ist allerdings als unsicheres Kriterium zum Entscheid darüber, ob Verbände chiasmatisch gebunden sind oder verklebte Pseudoverbände darstellen, anzusehen, da zumindest Pseudobivalente in ihrer Form echte Bivalente mit terminalen, subterminalen, interstitiellen oder lateralen Chiasmata durchaus kopieren können (WALTERS 1954).

Ein überzeugender Hinweis auf chiasmatische Bindung eines Teiles der Chromosomen und auf das Vorhandensein von Duplikationen im haploiden Chromosomensatz von *A. majus* ist demgegenüber in der Brücken-Bivalent-Konfiguration in der Pflanze 554/5 zu sehen, die wohl unter allen Umständen eine chiasmatische Bindung der beteiligten Chromosomen nach Austausch zwischen duplizierten Segmenten anzeigt.

Damit dürfte feststehen, daß ein Teil der Paarungsverbände chiasmatisch gebunden ist, und der Anteil dieser wahrscheinlich besonders leicht und bevorzugt angelegten Chiasmata dürfte sich auf etwa 40% (0,32) der Chiasmafrequenz von 0,8 belaufen. Es konnte gezeigt werden, daß bei einer Unterteilung der Minimalchiasmafrequenz von 0,8 in zwei Fraktionen von 0,32 und 0,48 (Tabelle 8) der  $\chi^2$ -Wert bei Vergleich von Chiasma- und Poisson-Verteilung von 61,42 auf 4,246 abfiel und die Chiasmaverteilung sich dabei stark der Poisson-Verteilung näherte. Der minimale  $\chi^2$ -Wert wurde durch Ausprobieren erhalten. Fehler durch Nicht-Berücksichtigung einer Chiasmainterferenz sind bei den Haploiden kaum zu erwarten, da die Chiasmafrequenz von 0,8 je Zelle viel zu niedrig liegt.

Die Verschiebung im  $\chi^2$ -Wert spricht, sofern der Wert von 0,8 seine Gültigkeit hat, für eine zufallsgemäße Anlage von etwa 60% (0,48 von 0,8) der Chiasmata, die sich theoretisch auf dreierlei Weise erklären ließe:

1. Durch die Annahme einer Austauschmöglichkeit begrenzten Umfanges zwischen inhomologen gepaarten Segmenten im Pachytän;
2. durch die Annahme einer ganzen Reihe kleiner Duplikationen im haploiden Satz und
3. wiederum dadurch, daß es sich in einem Teil der Fälle nicht um chiasmatisch gebundene Verbände, sondern um Pseudoverbände handelt, welche ungerechtfertigterweise chiasmatisch gedeutet wurden.

Diese verschiedenen Erklärungsmöglichkeiten lassen sich an unserem Material nicht ohne weiteres gegenseitig ausschließen. Mehr als eine intrachromosomale und eine interchromosomale Duplikation ließen sich cytologisch nicht wahrscheinlich machen, und genetische Anhaltspunkte für ihre Existenz liegen auch nicht vor. Duplikationen können also zur Deutung der praktisch zufallsgemäßen Anlage eines Teiles der „Chiasmata“ nur unter großen Vorbehalten herangezogen werden.

Demgegenüber scheint aber das Auftreten von einem oder zwei Trivalenten in einer Reihe von PMZ dafür zu sprechen, daß auch zwischen inhomologen, gepaarten Segmenten im begrenzten Umfang Austauschvorgänge und Chiasmabildung erfolgen können, da eine chiasmatische Deutung dieser Trivalente nur unter Annahme einer unwahrscheinlich hohen Anzahl von Duplikationen möglich wäre, wenn die Chiasmabildung auf homologe Bereiche beschränkt ist. Durch eine Chiasmabildung zwischen inhomologen gepaarten Segmenten ließe sich zwar die etwa zufallsgemäße Anlage von etwa 60% der Chiasmata relativ zwanglos deuten, aber eine solche Interpretation stellt nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens eine reine Spekulation dar, die durch parallele genetische Experimente zu unterbauen wäre, welche aber auf

Grund von ausgeprägter Sterilität an den haploiden Formen nicht erfolgen können.

Wenn schon die Frage offenbleiben muß, ob eine Chiasmabildung zwischen inhomologen gepaarten Segmenten möglich ist oder nicht, so kommt noch die oben angedeutete dritte Deutungsmöglichkeit der anscheinend zufallsgemäßen Anlage eines Teiles der „Chiasmata“ hinzu, die besagt, daß die betreffenden Verbände keine chiasmatisch gebundenen, sondern Pseudoverbände darstellen. Neben der spekulativen Annahme einer Austauschmöglichkeit zwischen inhomologen Chromosomenbereichen bleibt daher auch noch diese Alternative offen, und die Natur der besagten Verbände muß fraglich bleiben. Vielleicht können die in Angriff genommenen Arbeiten an trisomen Formen von *A. majus* einen Aufschluß erbringen.

Zusammenfassend ergibt sich zur Frage der Natur der Paarungsverbände in der Anaphase I, daß aller Wahrscheinlichkeit nach ein Teil dieser Verbände chiasmatisch gebunden ist und die Chiasmata dieser Fraktion etwa 40% der „Chiasmafrequenz“ von 0,8 je PMZ ausmachen. Die Anlage der Chiasmata dürfte zwischen duplizierten Bereichen erfolgen. Der Rest der „Chiasmata“ wurde annähernd zufallsgemäß angelegt, und eine Entscheidung darüber, ob es sich um echte Chiasmata handelt oder die fraglichen Verbände Pseudoverbände darstellen, ist mit Sicherheit nicht möglich.

### c) Phylogenetische Ausblicke

Die sich aus dem Paarungsverhalten und dem Meioseablauf bei haploiden Formen ergebenden Schlußfolgerungen für die Phylogenie von *A. majus* sind von ERNST (1940) ausführlich diskutiert worden. Die an sich naheliegende Annahme, daß *A. majus* eine sekundär polyploide Art mit der Grundzahl 4 ist, dürfte durch die komplexe Pachytänpaarung, den weiteren Meioseverlauf und die niedrige durchschnittliche Chiasmafrequenz von 0,8, die selbst in dieser Höhe noch eine unsichere Größe darstellt, als unwahrscheinlich anzusehen sein.

Während ERNST (l. c.) zu dem Schluß kam, daß die Untersuchungsergebnisse zum Meioseverlauf im Hinblick auf die Evolution der Gattung am besten so zu deuten wären, daß im Verlauf der Phylogenie ein oder zwei Chromosomen verdoppelt wurden, läßt sich mit dem gleichen Recht annehmen, daß im Verlauf der Entwicklung im haploiden Chromosomensatz durch Translokationen und Transpositionen eine beschränkte Anzahl von ausdehnungsmäßig begrenzten Duplikationen eingetreten ist. Eine prinzipielle, experimentell fundierte Unterscheidung zwischen diesen beiden Möglichkeiten ist gegenwärtig nicht möglich.

### Summary

1. Meiosis of haploid forms of *Antirrhinum majus* L. ( $n = 8$ ) is characterized by an extremely high degree of pairing between inhomologous or partially homologous chromosomes. In extreme cases this pairing leads to the formation of four bivalents. Besides bivalents trivalents and more complex pairing configurations were found in pachytene. Fold-backs of whole chromosomes or of chromosome segments occurred in a considerable number of PMC. Pairing within the haploid chromosome set took place in most cases between inhomologous chromosome segments, but in later stages of first meiotic division it was possible to show the existence of at least one intrachromosomal and one interchromosomal duplication. The interchromosomal duplication causes preferential pairing of two specific chromosomes.

2. In diakinesis and meta-anaphase I pairing — configurations consisting of two or more chromosomes were found. According to form and valence of these configurations it was possible to establish with certain reservations a minimal chiasma frequency of 0.8 per PMC. One part (40%) of chiasmata is probably formed between the segments of the interchromosomal duplication. The other 60% are either chiasmata between further duplications, which cannot be demonstrated cytologically, or chiasmata between inhomologous segments. The possibility is not excluded that part of these configurations are not held together by chiasmata, but are pseudoconfigurations caused by matrix stickiness.

3. The various PMC-types are grouped according to the different combinations of uni-, bi- and multivalents found in them. 42,34% of the analyzed PMC contained 8 univalents, 39,82% one bivalent, 11,94% two bivalents, 2,14% three bivalents, 0,27% four bivalents. The last 3,49% of PMC were characterized by trivalents and a few higher associations.

4. The abnormal second meiotic division was analyzed in order to find out the way of origin of the various types of sporades containing one to eight microspores. Dividing univalents in first meiotic division, the type of distribution of univalents to the poles, the formation of restitution nuclei and abnormal cytokinesis were found to be responsible for the development of the different types of sporades. The haploid plants were practically self-sterile but by pollination with diploid forms some progeny could be raised.

5. Form, extent and consequences of inhomologous pairing are discussed. It is supposed that there is a general pairing tendency of unknown nature in meiotic prophase which will be saturated by preferential contact between homologous chromosomes. The existence of homologous partners is supposed to prevent pairing of inhomologous



chromosomes. But if there are only inhomologous chromosomes within one nucleus the general pairing tendency in meiotic prophase leads to associations of inhomologous chromosomes. The existence of homologous segments within one set of mostly inhomologous chromosomes causes preferential pairing of these identical regions, but does not suppress inhomologous pairing.

### Literatur

- BEERMANN, W.: Chromosomenkonstanz und spezielle Modifikationen der Chromosomenstruktur in der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*. *Chromosoma* 5, 139—198 (1952). — BOSEMARK, N. O.: On accessory chromosomes in *Festuca pratensis*. IV. Cytology and inheritance of small and large accessory chromosomes. *Hereditas* (Lund) 42, 235—259 (1956). — CATCHESIDE, D. J.: The chromosomes of a new haploid *Oenothera*. *Cytologia* (Tokyo) 4, 68—113 (1932). — CHIZAKI, Y.: Another new haploid plant in *Triticum monococcum* L. *Bot. Mag. (Tokyo)* 48, 621—628 (1934). — CONGER, A. D., and L. M. FAIRCHILD: A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technol.* 28, 281—283 (1953). — DARLINGTON, C. D.: Recent advances in cytology, 2 Aufl. London 1937. — ERNST, H.: Meiosis and Crossing-over. *Zytologische und genetische Untersuchungen an Antirrhinum majus* L. *Z. Bot.* 33, 241—294 (1938). — Zytogenetische Untersuchungen an *Antirrhinum majus* L. *Z. Bot.* 34, 81—111 (1939). — Zytogenetische Untersuchungen an haploiden Pflanzen von *Antirrhinum majus* L. I. Die Meiosis. *Z. Bot.* 35, 161—189 (1940). — FRIEDRICH-FREKSA, H.: Bei der Chromosomenkonjugation wirksame Kräfte und ihre Bedeutung für die identische Reproduktion von Nucleoproteinen. *Naturwiss.* 28, 367—379 (1940). — HAGA, T.: Meiosis in Paris. II. Spontaneous breakage and fusion of chromosomes. *Cytologia* (Tokyo) 18, 50—66 (1953). — HÅKANSSON, A.: Die Meiose bei haploiden Pflanzen von *Godetia*. *Hereditas* (Lund) 26, 411—429 (1940). — HUGHES-SCHRADER, S.: Origin and differentiation of the male and female germ cells in the hermaphrodite of *Icerya purchasi* (Coccidae). *Z. Zellforsch.* 6, 509—540 (1927). — IVANOW, M. A.: Experimental production of haploids in *Nicotiana rustica* L. *Genetica* ('s-Gravenhage) 20, 295—386 (1938). — KATAYAMA, Y.: Karyological comparison of haploid plants from octoploid *Aegilotriticum* and diploid wheat. *Jap. J. Bot.* 7, 349—380 (1939). — KIHARA, H., and Y. KATAYAMA: Reifungsteilungen bei dem haploiden *Triticum monococcum*. *Agricult. a. Horticult.* 8, 1—17 (1933). — KNAPP, E.: Haploide Pflanzen von *Antirrhinum majus*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 57, 371—379 (1939). — KOSTOFF, D.: The problem of haploidy. *Bibliogr. genet.* 13, 2—144 (1942). — LEVAN, A.: Studies on the meiotic mechanism of haploid rye. *Hereditas* (Lund) 28, 177—211 (1942). — A haploid sugar beet after colchicine treatment. *Hereditas* (Lund) 31, 399—410 (1945). — LIMA DE FARIA, A.: The structure of the centromere of the chromosomes of rye. *Hereditas* (Lund) 35, 77—85 (1949). — The division cycle of the kinetochore. *Hereditas* (Lund) 41, 238—240 (1955). — The role of the kinetochore in chromosome organization. *Hereditas* (Lund) 42, 85—160 (1956). — LINDSTROM, E. W., and K. KOOS: Cytogenetic investigations of a haploid tomato and its diploid and tetraploid progeny. *Amer. J. Bot.* 18, 398—410 (1931). — MC CLINTOCK, B.: The association of non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea Mays*. *Z. Zellforsch.* 19, 191—237 (1932). — MECHELKE, F., u. H. STUBBE: Studien an mutablen Genen. I. *Antirrhinum majus* L. *mut. graminifolia*. *Z. Vererbungslehre* 86, 224—248 (1954). — NEWTON, W. C. F., and G. D. DARLINGTON: Meiosis in polyploids. I. Triploid and pentaploid tulips. *J. Genet.* 21, 1—15 (1929). — ÖSTERGREN, G.:

The mechanism of coorientation in bivalents and multivalents. *Hereditas* (Lund) **37**, 85—156 (1951). — PERSON, C.: An analytical study of chromosome behaviour in a wheat haploid. *Canad. J. Bot.* **33**, 11—30 (1955). — RHOADES, M. M.: Preferential segregation in maize. In J. W. GOWEN, *Heterosis*, S. 66—80. Yowa State Coll. Press 1952. — RIBBANDS, C. R.: The consequences of structural hybridity at meiosis in *Lilium testaceum*. *J. Genet.* **35**, 1—25 (1938). — SERRA, J. A.: Composition of chromonemata and matrix and the role of nucleoproteins in mitosis and meiosis. *Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 192—210 (1947). — Physical chemistry of the nucleus. In W. RUHLAND, *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. I, S. 472—506. Berlin: Springer 1955. — TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie, 2. Aufl., 2. Hälfte. Berlin 1951. — Allgemeine Pflanzenkaryologie. *Erg.-Bd.*, 1 Liefg. Berlin 1953. — TJIO, H. S., and A. LEVAN: Quadruple structure of the centromere. *Nature* (Lond.) **165**, 338 (1950). — TOMETORP, G.: Cytological studies of haploid *Hordeum distichum*. *Hereditas* (Lund) **25**, 241—254 (1939). — WALTERS, M.: Spontaneous breakage and reunion of meiotic chromosomes in the hybrid *Bromus Trinitii*  $\times$  *B. maritimus*. *Genetics* **35**, 11—37 (1950). — WALTERS, M. S.: Atypical chromosome movement in meiotic anaphase of *Bromus pitensis*  $\times$  *B. marginatus*. *Amer. J. Bot.* **39**, 619—625 (1952). — A study of pseudobivalents in meiosis of two interspecific hybrids of *Bromus*. *Amer. J. Bot.* **41**, 160—171 (1954). — WALTERS, M., and A. B. GRIFFEN: The telomeres of *Drosophila*. *J. Hered.* **41**, 183—190 (1950).

Dr. RIGOMAR RIEGER, Gatersleben, Kreis Aschersleben,  
Institut für Kulturpflanzenforschung



From the Department of Botany, Oxford University

## THE IRRADIATION OF DIVIDING CELLS

### I. THE EFFECTS OF X-RAYS ON PROPHASE CHROMOSOMES

By

DOUGLAS DAVIDSON

With 5 Figures in the Text

(Eingegangen am 19. August 1957)

#### I. Introduction

The chromatids formed by reproduction in the resting stage normally separate at anaphase. The separation, however, may be impeded:

(i) In a dicentric chromosome showing criss-cross separation of chromatids.

(ii) In a dicentric chromatid formed by sister reunion (SR) or chromatid reunion (R').

(iii) By stickiness.

Dicentric chromatids do not separate until the bridges they form at anaphase have snap-

ped. Stickiness may affect the whole surface of the chromosomes, as, for example, after treatment with ethylene glycol (ÖSTERGREN 1944) or X-rays (DARLINGTON and LA COUR 1945). At other times the stickiness is localised; the two chromatids are attached only at certain points. It is with this localised stickiness that I am here concerned.

Localised stickiness occurs in many species and tissues and after many kinds of treatment (Table 1). Like chromosome and chromatid breakage and reunion it now seems to be a characteristic type of chromosome behaviour. A localised chromatid stickiness has been called a "pseudo-chiasma" (LEVAN and TJO 1948), a "point effect" (REES 1952) and a "point error" (LA COUR and RUTISHAUSER 1954); *point union* will be the term used here.

A point union may be interstitial or terminal. Each type of union has a characteristic appearance at anaphase (Fig. 1). The two chromatids are held together at the point of attachment, then, as the centromeres move to the poles, the segments of the chromatid arms proximal to

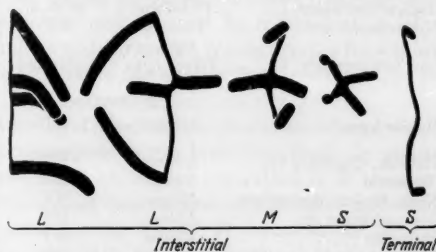


Fig. 1. Homologous point unions in root-tip chromosomes of *Hyacinthus* (3x). 100 r. 7 hrs.  $\times 1700$

Table 1. *Previous observations of stickiness*

Cause	Genus	Tissue	Author	Date
<i>A. Internal (or partly internal)</i>				
Gene mutation . . . . .	<i>Zea</i>	p. m. c	BEADLE	1932
Segregation after inbreeding . . . . .	<i>Secale</i>	p. m. c	LAMM	1936
Hybridity . . . . .	<i>Chorthippus</i>	s. m. c	KLINGSTEDT	1939
	<i>Secale</i>	p. g.	MÜNTZING	1946
Segregation after inbreeding . . . . .	<i>Secale</i>	p. g.	MÜNTZING and ARDIK	1948
	<i>Scilla</i>	RT	REES	1952
	<i>Hyacinthus</i> (3 x)	endosperm	BROCK	1953
<i>B. External</i>				
1. Temperature				
High temperature . . . . .	<i>Fritillaria</i>	p. m. c	BARBER	1940
Low temperature <sup>1</sup> . . . . .	<i>Trillium</i> spp.	RT	DARLINGTON and LA COUR	1940
Low temperature . . . . .	<i>Triton</i> spp.	testes tail	CALLAN	1942
2. Chemicals				
Mustard gas <sup>2</sup> . . . . .	<i>Allium</i>	RT	DARLINGTON and KOLLER	1947
Phenols, Quinones etc. . . . .	<i>Allium</i>	RT	LEVAN and TJIO	1948
Coumarin . . . . .	<i>Allium</i>	RT	ÖSTERGREEN	1948
Naphthalene derivatives	<i>Allium</i>	RT	AVANZI	1950
Acenaphthene etc. . . . .	<i>Allium</i>	RT	D'AMATO	1950
Penicillin . . . . .	<i>Allium</i>	RT	LEVAN and TJIO	1951
Purine derivatives . . . . .	<i>Allium</i> <sup>4</sup>	RT	KIHLMAN	1952
Coumarin derivatives <sup>3</sup> . . . . .	<i>Allium</i>	RT	D'AMATO and D'AMATO AVANZI	1954
8-ethoxy-caffeine <sup>3</sup> . . . . .	<i>Allium</i>	RT	KIHLMAN	1955
3. Irradiation				
X-rays <sup>3</sup> . . . . .	<i>Tradescantia</i>	p. tube	SWANSON	1943
X-rays . . . . .	<i>Trillium</i> spp.	RT	DARLINGTON and LA COUR	1945
X-rays + Ultra-violet . . . . .	<i>Tradescantia</i>	p. tube	SWANSON	1947
X-rays <sup>1</sup> . . . . .	<i>Tradescantia</i>	p. m. c	HAQUE	1952
X-rays . . . . .	<i>Tradescantia</i>	p. g.	KOLLER	1952
X-rays . . . . .	<i>Scilla</i>	RT	REES	1952
X-rays <sup>3</sup> . . . . .	<i>Scilla</i>	endosperm	LA COUR and RUTISHAUSER	1954
X-rays . . . . .	<i>Lilium</i>	p. m. c	CROUSE	1954
X-rays . . . . .	<i>Chortophaga</i>	neuroblasts	CARLSON and HARRINGTON	1955
X-rays <sup>3</sup> . . . . .	<i>Tradescantia</i>	p. m. c. p. g. RT	SAX and KING	1955

<sup>1</sup> Effects later described by LA COUR and RUTISHAUSER (1954) as sub-chromatid.<sup>2</sup> Also *Tradescantia bracteata* p. m. c. and p. g.<sup>3</sup> Attributed to sub-chromatid breakage and reunion.<sup>4</sup> Also *Pisum sativum* RT.

the union are drawn out into thin bridges. In a terminal union, where the ends of the chromatids are joined, the bridge between the centromeres thus consists of two whole chromatid arms. In an interstitial union, however, there are also segments distal to the point union; these segments, never subjected to the stress of anaphase, remain thick and contracted and just as they were at metaphase. Unions between non-homologous loci of sister chromatids always result in two distal segments of unequal length; a similar result is usual in unions between non-sister chromatids.

Point unions appear to be the result of breakage and reunion. LA COUR and RUTISHAUSER (1954) suggest that sub-chromatid fractions are involved. ÖSTERGREN and WAKONIG (1954) consider that the whole chromatid is broken and that the attachment is formed by the fusion of matrix material.

Point unions are induced during prophase. In serial fixations they appear before chromatid breaks and so must be induced at a later stage of mitosis. Point unions and chromatid breaks overlap for a short period. This period probably marks the change from resting stage to prophase.

The spontaneous occurrence of localised chromatid stickiness which appears to have adaptive consequences has been described. In pollen grains of *Secale* (MÜNTZING 1946) chromatid separation in B chromosomes is prevented. The consequent increase first in generative and then in sperm nuclei compensates for the loss of B chromosomes during meiosis. Similarly in *Sciara coprophila* (DU BOIS 1933) stickiness during early embryonic cleavages seems to be the means of reducing the chromosome number in somatic cells and so determining the sex of the offspring.

Chromatid separation continues to be normal near the centromere even when conditions within the nucleus have been upset by irradiation. Thus, point unions have never been found at the centromere; and distal segments are always shorter than the chromatid arms from which they were formed. The length of chromosome arm next to the centromere which is free from aberrations has been called the "interference distance" (REES 1952). This distance, which is peculiar to each type of chromosome, is calculated as the length of chromosome arm at metaphase minus the length of the longest distal segment. From the presence of an interference distance, it may be inferred that centric activity is controlling chromosome behaviour as revealed by point union formation. The interference distance would then measure the extent of centric control along the chromosome. The effect of interference on the distribution and position of point unions is most marked in short chromosomes, in which point unions occur in low frequency (REES 1952) and

in which most of the chromosome may be included within the interference distance.

In addition to the centromere, the nucleolar organiser also appears to affect the distribution of point unions (BROCK 1955); errors were very frequent in nucleolar chromosomes. But the endosperm with which BROCK worked gave other evidence of being abnormal. The possible effect of the nucleolar organiser on point union formation in normal tissues was therefore studied at the same time as the effects of the centromere on induced unions were being determined.

## II. Materials and Methods

(i) *Hyacinthus* var. King of the Blues (3x). Bulbs were raised in a cool greenhouse at 18° C. The X-ray dose was 100 r.

(ii) *Vicia faba* var. Carter's Aquadulce Longpod. Beans were germinated and grown in aerated distilled water changed every 24 hours. The growth cabinet was maintained at 19° C. Treatments were started when the laterals were 1 cm. long.

The X-ray dose of 100 r was given in 50 secs. at 5 ma. and 70 Kvp. It was given, unfiltered, from a Newton Victor machine at a focal distance of 25 cms.

8 ethoxy-caffeine<sup>1</sup> treatments were given for 1 hour in an 8 mM solution.

X-ray doses of 40, 80 and 100 r were tried on *Vicia*. With 40 and 80 r there are few affected anaphases. Their frequency is satisfactory after 100 r however and surface stickiness, which occurs after high doses, is negligible.

(iii) Roots of *Hyacinth* and *Vicia* were fixed in 2 BD diluted after 1 hour with an equal volume of 1% chromic acid. 12–24 hours later they were washed repeatedly in distilled water to remove fixative. Bleaching and maceration was carried out in saturated ammonium oxalate and 20 vol. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. After hydrolysing in NHCl at 60° C for 12 minutes the roots were stained in Feulgen. They were prepared as squashes and made permanent according to the method of DARLINGTON and LA COUR.

(iv) The chromosomes: *Hyacinthus* and *Vicia*.

In *Hyacinthus* the chromosomes can be classified into five types (DARLINGTON et al. 1951); the types and the abbreviations are:

L : long

L<sup>n</sup>: long, with nucleolar constriction

M : medium

S<sub>1</sub> : short, with long short arm

S<sub>2</sub> : short, with short short arm.

<sup>1</sup> I wish to thank Dr. KIHLMANN for the gift of a sample of 8 ethoxycaffeine.

In anaphase in root-tips of King of the Blues (3 x) the third nucleolar constriction was not always distinguishable. As  $L^n$  effects might have scored as L effects,  $L^n$  and L chromosomes were lumped in scoring;  $S_1$  and  $S_2$  were treated similarly. Effects were scored as having occurred in L, M or S chromosomes.

The total length ratio of L:(M + S) chromosomes was found to be 2.7:1. This agrees with the ratios calculated from previous measurements of *Hyacinth* chromosomes (DARLINGTON et al. 1951, 2.8:1; BROCK 1955, 2.7:1).

In *Vicia* the chromosomes fall into two groups:

1. M chromosomes, about  $13.3\mu$  long, median centromere, with a nucleolar constriction.

2. S chromosomes,  $7-8\mu$  long, sub-terminal centromere.

The types of arms in M or S chromosomes are denoted by superscripts:

$M^N$ : nucleolar arm of M chromosome

$M^S$ : non-nucleolar arm

$S^L$ : long arm of S chromosome

$S^S$ : short arm of S chromosome

S chromosomes can be separated at metaphase according to the length of the short arm. As this was not possible at anaphase S chromosomes were lumped in scoring.

The total length ratio of S:M chromosomes is 2.44:1 (cf. 2.2:1, REVELL 1952; 2.5:1, OEHLKERS 1952).

(v) Classification of point unions:

Point unions were classified according to:

1. Position; whether interstitial or terminal.

2. Whether between homologous or non-homologous loci.

3. If non-homologous, whether intra-chromosome or inter-chromosome.

4. The chromosome type with the error.

5. The chromosome arm with the error; whether long or short, nucleolar or non-nucleolar.

In homologous point unions, sister-chromatids are associated at the same locus, so giving distal segments of equal length. Intra-chromosome errors involve sister-chromatids but at different loci; the distal segments are unequal. Inter-chromosome errors involve chromatids from different chromosomes. The lengths of whole chromosomes or of distal segments in point errors were calculated from camera lucida drawings.

### III. Results

#### 1. Point unions in *Hyacinthus*

Point unions occur in anaphases in roots of *Hyacinthus* fixed 2 and 7 hours after irradiation. At both times point unions were found in S,

M and L chromosomes. Data was collected, however, only from roots of the variety King of the Blues (3x), fixed 7 hours after X-raying.

Point unions, though present in S and M chromosomes (cf. BROCK 1955) were more frequent in L chromosomes (Table 2). The effects ratio L:(M+S) is 5.3:1, compared with a length ratio of 2.7:1. The data on which the ratio of point unions is based is not extensive; but they do show that point unions induced in roots and spontaneous unions in

Table 2. *The distribution of point unions in root-tip chromosomes of Hyacinthus (3x). 100 r/7 hours*

Homologous point unions						
Position of point union	L	M arms		S arms		Total
		Long	Short	Long	Short	
Interstitial .	40	3	—	1	—	44
Terminal . .	3	1	1	2	—	7
Total . . .	43	4	1	3	—	51

endosperm are distributed differently. Induced unions occur in S and M as well as in L chromosomes; they are mainly interstitial in position. Spontaneous unions, in contrast, occur only in L chromosomes and are frequently terminal in position.

The interference distance has been calculated to be 2.5, 1.0 and 0.7  $\mu$  for L, M and S chromosomes respectively. With more observations these distances would probably be reduced. All the point unions seen

in *Hyacinthus* roots were between homologous loci. In L chromosomes terminal unions were much less frequent than interstitial unions (Table 2).

Table 3. *Frequencies of anaphases showing point unions at various times after X-raying with 100 r. Vicia faba roots*

Time (hours)	Total anaphases	Total affected	% affected
$\frac{1}{4}$	76	—	—
$\frac{1}{2}$	148	27	18.2
1	172	78	45.4
$1\frac{1}{2}$	197	94	47.7
2	146	82	56.2

## 2. Point unions in *Vicia faba*

The distribution of point unions was determined in anaphases in roots fixed  $\frac{1}{2}$ , 1,  $1\frac{1}{2}$  and 2 hours after irradiation.

Point unions are not induced at the end of prophase, even if the dose is increased to 250 r (Table 3:  $\frac{1}{4}$  hour fixation). In fixations later than 2 hours point unions occur only in low frequency and mixed with chromatid breaks.

The majority of point unions in roots of *Vicia faba* involve homologous loci of sister-chromatids (Fig. 2a, Table 4). Non-homologous point unions (Fig. 2b) also involve sister-more often than non-sister-chromatids. Non-homologous associations are induced only during the first part of

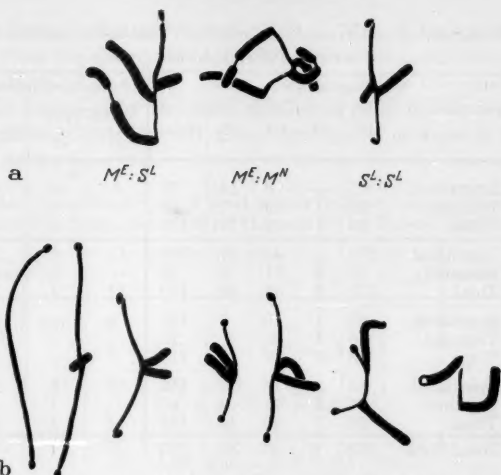


Fig. 2a and b. a Non-homologous unions. *Vicia faba* roots. 100 r. b Point unions in reotip chromosomes of *Vicia faba*. Those nearest the centromere on the right. 100 r.  $\times$  1600

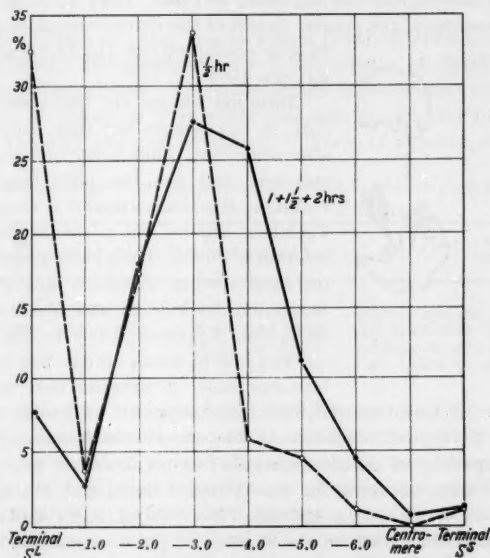


Fig. 3. Frequency of point unions classified according to distances in  $\mu$  from the chromosome end. Given as percentages. *Vicia faba* S chromosomes only. 100 r. Data from Table 6

Table 4. Frequencies of point unions in roots of *Vicia faba* at various times after receiving 100 r of X-rays

Hours after X-rays	Homologous unions					Non-homologous unions				
		S <sup>L</sup>	S <sup>S</sup>	M <sup>N</sup>	M <sup>E</sup>	Total	Intra-Type		S <sup>L</sup> :M <sup>N</sup>	S <sup>L</sup> :M <sup>E</sup>
							S <sup>L</sup>	M		
<sup>1</sup> / <sub>2</sub>	Interstitial	57	—	6	14	77	—	—	—	—
	Terminal	28	1	9	7	45	—	—	—	—
	Total	85	1	15	21	122	—	—	—	—
1	Interstitial	299	—	42	37	378	11	3	7	—
	Terminal	26	6	11	9	52	—	1	—	—
	Total	325	6	53	46	430	11	4	7	—
<sup>1</sup> / <sub>2</sub>	Interstitial	87	—	10	9	106	3	—	1	—
	Terminal	6	1	3	2	12	—	—	—	—
	Total	93	1	13	11	118	3	—	1	—
2	Interstitial	85	—	15	12	112	4	2	1	2
	Terminal	7	1	1	1	10	—	1	—	—
	Total	92	1	16	13	122	4	3	1	2
	Grand Total	596	9	97	91	793	18	7	9	4

prophase; they are not found at all in the  $\frac{1}{2}$  hour fixation. Intra-chromatid associations did not occur in *Vicia*. They do occur in *Scilla*, possibly because of the greater length of the chromosomes, and give rise to loop configurations (LA COUR and RUTIS-HAUSER 1954).



Fig. 4. Late anaphase in *Vicia faba* root-tip. Both distal segments are moving to one pole. 100 r.  $\times 1600$

Terminal unions are like sister-reunions (SR) in appearance but they do not persist after anaphase. They occur in S and M chromosomes and are the only type of error found in the short arms of S chromosomes. Terminal unions are never as frequent as interstitial unions. Their percentage frequency increases during prophase and reaches its maximum, in both S and M chromosomes, in  $\frac{1}{2}$  hour fixations (Table 4, Fig. 3).

The fate of point unions was followed at late anaphase. Fragments were never seen.

Either one bridge snaps and both distal segments are pulled to one pole (Fig. 4) or the segments separate at the point of attachment.

A comparison of the mean number of point unions per cell shows that the values obtained for the  $\frac{1}{2}$  and 1 hour, and  $1\frac{1}{2}$  and 2 hour fixations are significantly different ( $P = \ll 0.01$ , and  $< 0.01$ : Table 5). In each individual fixation the number of point unions per cell fits a Poisson distribution ( $\chi^2$  and P values in Table 5). But when the four distributions are compared by means of a contingency table it is found



that they are significantly different ( $X^2 = 75.6$ : d. f. = 12 and  $P = < 0.01$ ). Thus the distribution of point unions between cells differs at different stages of prophase. Taken with the fall in the sensitivity to X-rays, as measured by the mean number of point unions per cell and by the number of cells affected, this is evidence of changes in the chromosomes during prophase.

Table 5. *The frequencies per cell of point unions in Vicia faba root-tips at various times after an X-ray dose of 100 r. Values of  $X^2$  for Poisson distribution*

Time (hours)	No. of point unions per cell					Total		P. U. per cell
	0	1	2	3	4	P. U.	Cells	
1/2	121	23	4	—	—	31	148	0.21
	$X^2 = 0.67$ . d. f. = 1. $P = 0.3-0.5$							
1	94	50	22	6	—	112	172	0.65
	$X^2 = 2.8$ . d. f. = 2. $P = 0.2-0.3$							
1 1/2	103	69	22	3	—	122	197	0.62
	$X^2 = 1.66$ d. f. = 2. $P = 0.3-0.5$							
2	64	46	23	12	1	132	146	0.90
	$X^2 = 2.78$ . d. f. = 2. $P = 0.2-0.3$							

The distribution of point unions within S and M chromosomes was also determined. The measurements of the lengths of distal segments were grouped into classes. The scale chosen had divisions of  $1 \mu$ . The distribution of unions in S chromosomes was determined for all four fixations (Table 6), and then compared by means of a contingency table.

Table 6. *Positions of point unions classified according to distance from the end in  $\mu$  Vicia faba S chromosomes only. 100 r*

Hours after X-raying	S <sup>L</sup> term.	0.1-1.0	1.1-2.0	2.1-3.0	3.1-4.0	4.1-5.0	5.1-6.0	6.1-	S <sup>S</sup> term.	Total
1/2	28	3	15	29	5	4	1	—	1	86
1	10	4	16	38	35	14	8	1	2	128
1 1/2	6	3	22	23	28	7	4	—	1	94
2	7	3	18	28	18	14	4	—	1	93

They were found to differ significantly ( $X^2 = 60.8$ : d. f. = 15,  $P = < 0.01$ ). Separate comparisons of 1/2 and 1 hour, 1 and 1 1/2 hour, and 1 1/2 and 2 hour fixations showed that only the 1/2 and 1 hour fixations had significantly different distributions of point unions ( $X^2 = 35.9$ : d. f. = 5,  $P = < 0.01$ ). In S chromosomes of the 1/2 hour fixation the interstitial unions occur further from the centromere than in other fixations. Also terminal unions are more frequent (Fig. 3). This is further evidence of chromosomal changes during prophase.

The distribution of point unions within M chromosomes was found only for the 1 hour fixation. The pattern of distribution in the two arms was not significantly different ( $X^2 = 6.2$ ; d. f. = 5,  $P = 0.2-0.3$ . Fig. 5) and appears to be similar to that in the long arms of S chromosomes. The frequencies of effects in the two arms of the M chromosomes are approximately equal in all fixations. This contrasts with the S

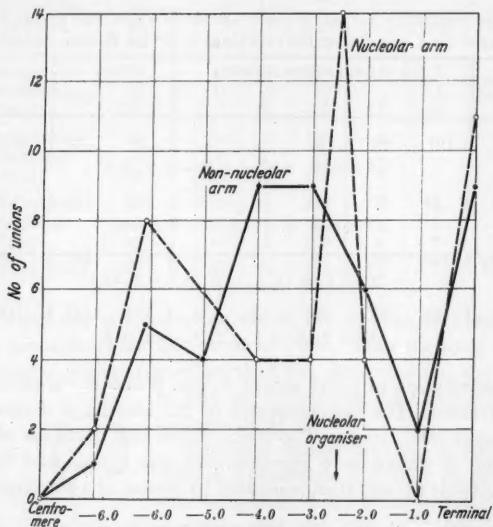


Fig. 5. Frequency of point unions classified according to distances in  $\mu$  from the chromosome end. *Vicia faba* M chromosomes only. 1 hr. after 100 r

chromosome where the length ratio of the two arms is 9.4:1 but the ratio of point unions in the two arms is 66:1. The low frequency of unions in short arms agrees with the results of REES (1952).

Certain conclusions may be drawn from these results. They are:

- (i) Point unions close to the centomere are rare. The region free from errors is about  $0.7 \mu$  long in all chromosome arms.
- (ii) A second region with a low frequency of unions occurs  $1 \mu$  from the end of the chromosome.
- (iii) The majority of point unions occur in the middle third of each long arm. This region shows up to 60% of all effects.
- (iv) The centomere appears to play some part in determining the distribution of point unions.
- (v) The chromosomes become less sensitive to X-rays towards the end of prophase.

### 3. The S:M ratio of effects in *Vicia faba*

At the beginning and end, but not in the middle of prophase, the distribution of point unions between S and M chromosomes is proportional to chromosome length (Table 7). During mid-prophase the nucleolar or M chromosome is less sensitive than at the other times and has

Table 7. S:M ratios of homologous point unions (interstitial and terminal)

Length ratio	S:M ratio of point unions			
	1/2 hr.	1 hr.	1 1/2 hrs.	2 hrs.
2.44:1	2.39:1	3.34:1*	3.92:1*	3.21:1
Total point unions	122	430	118	122

\* Significantly different from length ratio at  $P = 0.05$ . Based on  $X^2$ .

a frequency of point unions which is lower than expected. Such a difference between S and M chromosomes in their sensitivity to X-rays does not occur during the resting stage (REVELL 1952; Table 8): breaks are then distributed according to chromosome length.

Breaks induced by chemicals may occur in certain chromosomes more often than in others (see discussion, section 3). 8-EOC induces, during resting stage, breaks which are disproportionately frequent in the M chromosome of *Vicia* (KIHLMANN and LEVAN 1951) and, during prophase, it also induces point unions (KIHLMAN 1952, 1955). Because of these two properties, the distribution of point unions induced by 8-EOC in the chromosomes of *Vicia* was determined.

As only two point unions, both of them between sister-chromatids, were terminal they have not been separated in the results (Table 9). The distribution of point unions between S and M chromosomes compared by means of a contingency table were not significantly different in the two fixations ( $X^2$  value obtained = 0.043. At d. f. = 1,  $P = 0.8-0.9$ ). The results were combined and give an S:M ratio of 1.3:1. This differs from the length ratio significantly ( $X^2 = 8.3$ . On 1 d. f.  $P$  is about 0.005).

The effects induced by 8-EOC during both resting stage and prophase are very frequent in M chromosomes. This indicates that there is a similarity between the two types of effect, perhaps in their mode of origin.

Table 8. Breakage in roots of *Vicia faba*, pretreated in paradichlorobenzene and prepared as Feulgen squashes

	Breaks		
	M	S	Ratio
New <sup>1</sup>	69	175	2.53:1
Revell <sup>2</sup>	24	58	2.40:1

<sup>1</sup> 13 hours after 100 r.

<sup>2</sup> 28 hours after 150 r.

Table 9. The frequency of point unions in *S* and *M* chromosomes of *Vicia faba* roots treated with 8 m. Mol. solution of EOC

EOC 1 hr.	Point unions							
	Homologous				Non-homologous			
	S	M <sup>N</sup>	M <sup>E</sup>	Total	Intra-chromosome		Inter-chromosome S : M	Total
					S	M		
+ 1½ hrs.	40	16	14	70	1	1	1	3
+ 2 hrs.	21	8	6	35	—	—	—	—
Total	61	24	20	105	1	1	1	3

The results from X-ray and chemical treatment agree in:

(i) The two arms of the *M* chromosome show equal frequencies of point unions.

(ii) The majority of point unions are homologous.

The differences in the results from the two types of treatment seem to be due to differences in the reactions of the *M* chromosome.

#### IV. Discussion

##### 1. Homologous and non-homologous point unions

Homologous point unions are usually the most frequent type of association. In some experiments they are the only type (Table 10). The only instance in which non-homologous unions were more frequent than homologous unions occurred in roots of *Allium* after treatment with coumarin (ÖSTERGREN and WAKONIG 1954). With this one exception, unions involving different chromosomes are much less frequent than the chromatid exchanges ( $2B^1 + 2R^1$ ) which are induced during resting stage (McLEISH 1952; REVELL 1952; KIHLMAN 1955).

Terminal unions are homologous unions. Like non-homologous unions they vary in frequency between treatments and species (Table 10). Their resemblance to SR has already been noted. Some interstitial unions may be called terminal because their lengths are at the resolving limits of the microscope. Others could be derived by stretching under the stress of anaphase, from sub-terminal unions. This would explain the low frequency of point unions at the end of the chromosome. The origin of terminal and interstitial unions would then be the same (LA COUR and RUTISHAUSER 1954). This may not be true of all terminal unions however; others may result from true end to end fusion.

If terminal unions were the result of end to end joining, dicentric chromosomes, equal in length to two whole chromosomes, should be found in tetraploid  $X_2$  metaphases after colchicine treatment as the colchicine prevents chromatid separation by suppressing anaphase. Such

Table 10. *The occurrence of non-homologous and terminal point unions arising in various species spontaneously or after treatments*

Species	Agent	Non-homologous association		Terminal association		Author	Date
			Frequency		Frequency		
<i>Scilla campanulata</i>	X-rays	—	—	+	45%	REES	1952
<i>Scilla sibirica</i>	X-rays	+		+	12%	LA COUR and RUTISHAUSER	1954
<i>Allium cepa</i>	Coumarin	+	50% <sup>1</sup>			ÖSTERGREN and WAKONIG	1954
<i>Hyacinthus orientalis</i>	Spon-taneous	+		+	50%	BROCK	1955
<i>Hyacinthus orientalis</i>	X-rays	—		+	14%	Present experiments	
<i>Vicia faba</i>	X-rays	+	0—8%	+	8—33%		
<i>Vicia faba</i>	EOC	+	3%	+	2%		

<sup>1</sup> Only after certain treatments.<sup>2</sup> Only 1 non-homologous association was found.

dicentricies were not found in  $X_2$  metaphases however, and their absence indicates that reunion is probably not involved in the formation of terminal unions.

## 2. The nature of point unions

Point union formation has been attributed to:

(i) The exchange of sub-chromatid fractions (AVANZI 1950; LA COUR and RUTISHAUSER 1954). This implies a multifibre structure of the chromosome.

(ii) Chromatid breakage masked by matrix (ÖSTERGREN and WAKONIG 1954).

Coumarin (ÖSTERGREN and WAKONIG 1954) and 8-EOC (KIHLMAN 1955) induce chromosome breaks and point unions. As both types of error induced by 8-EOC occur frequently in M chromosomes it seems likely that the effect of the chemical during prophase, as during resting stage, is to induce breakage of the chromosome fibres. But breakage alone will not lead to the appearance of point unions at anaphase; breakage must be followed by reunion.

The attachment in a point union appears to be more than mere lateral adhesion. It often persists when the chromatid bridges snap; it may consist of sub-chromatid reunions.

A multifibre structure of the chromosome has often been described (NEBEL 1937; WARMKE 1937; MANTON 1945, 1950), but never convincingly

demonstrated. The presence of fibres, or monids (DARLINGTON 1950) which can each undergo independent mutations, has been proposed from genetical evidence of delayed mutations (LEWIS and CROWE 1953) and the formation of mosaics (BIRD and FAHMY 1953). AUERBACH (1949) suggests however, that mosaics may be due to the formation of labile pre-mutations or unstable loci. The fibrous nature of extracted DNA (WATSON and CRICK 1953a and b) makes it likely that the chromosome consists of fibres. But whatever its ultimate structure, the chromosome has been found, in experiments in which breakage is induced by X-rays, to react as a single functional unit (LA COUR 1952; DAVIDSON unpub.; cf. CONGER 1947; also WALTERS 1955). Sub-chromatid breakage and reunion has been clearly demonstrated only in salivary glands (SLIZINSKI 1950; BIRD and FAHMY 1953; GEYER-DUSYNSKA 1955). In these glands, in the large chromosomes, which exceed other somatic chromosomes in their DNA content (VENDRELY 1955) and probably in the number of fibres present, the nature of the exchange is revealed. In smaller somatic chromosomes however, a similar exact analysis is not possible because of the size and coiling of the chromosomes.

A point union would appear in a tetraploid  $X_2$  metaphase, as ÖSTERGREN and WAKONIG supposed, as a chromatid exchange ( $2B^1 + 2R^1$ ), provided of course, the original exchange had been non-reciprocal; reciprocal exchanges would not be detected. Examination of such  $X_2$  divisions following colchicine treatment failed, however, to reveal the expected  $2B^1 + 2R^1$  configurations. But it was found that 71% of the metaphases had even numbers of breaks. The percentage after irradiation of telophase was 48%. The high percentage of cells with an even number of breaks suggests that chromosome breaks were induced; homologous point unions could be derived from them. WHITING and MURPHY (1956) have now shown that following irradiation of M1 in meiosis in *Habrobracon* eggs, double fragments appear at A1 and AII. They suggest that the two sister chromatids are broken at the same locus. The present evidence indicates that a chromosome break, though it is not visible, is involved in point union formation. There is no indication of the nature of the attachment which prevents chromatid separation at anaphase.

### 3. Chromosome length and the distribution of effects

The simplest assumptions that can be made in the experimental treatment of chromosomes are:

- (i) That all parts of a chromosome react similarly.
- (ii) That all chromosomes in a nucleus and all parts of a chromosome have an equal chance of being affected.

If these assumptions were true the frequency of changes shown by a chromosome would be proportional to its length, relative to the length

of the whole chromosome complement. Furthermore the chance of an error occurring in a particular chromosome could be calculated from the ratio of chromosome length. Though such ratios are simple, deviations from them reveal a great deal.

Certain mutants appear more often than others, showing how loci vary in their sensitivity to a mutagen (GUSTAFSSON 1954). Chromosome breaks may also be localised after chemical treatment (FORD 1948; KIHLMAN and LEVAN 1951; REVELL 1952; McLEISH 1952), and after irradiation (KAUFMANN 1939; SAX and MATHER 1939; GOTTSCHALK 1950). In *Vicia*, breaks induced by X-rays during the resting stage are distributed between S and M chromosomes according to their length (REVELL 1952; DEUFEL 1951). During parts of prophase, however, the ratio of effects induced by irradiation in S and M chromosomes of *Vicia* is not proportional to their lengths; M chromosomes show a lower frequency of point unions than expected.

The changing pattern of point union distribution in *Vicia* may be related to three factors:

- (i) The influence of the centromere on the position of the point union.
- (ii) The changes which take place in prophase chromosomes.
- (iii) The presence of nucleoli.

#### 4. The centromere and the position of point unions

Point unions are not distributed equally along the chromosome arms. They never form near the centromere. They occur in low frequency near the ends of chromosomes and are most frequent in the central third of the long arms. Furthermore, as prophase progresses, the frequency of point unions proximal to the centromere falls.

The absence of pro-centric point unions is taken as evidence that the changes which prevent point union formation in all parts of a chromosome at the end of prophase actually begin at the centromere. This process may be controlled by the whole genotype, or it may be under the direct and more specific control of the centromere. Only in the latter case it would be correct to speak of centric interference with the formation of point unions in the proximal regions. Furthermore, if their formation is prevented by changes in the chromosomes during prophase, centric interference is evidence of centric control of the process of change.

#### 5. Changes in prophase chromosomes

At the beginning of prophase the chromosomes appear as separate bodies within the nuclear membrane. Coincident with their appearance the chromosomes change in their response to irradiation; chromatid breaks which are induced during resting stage are no longer apparent



and are replaced by point unions. As prophase progresses other changes occur; the chromosomes begin to take up stains for which they show no affinity during resting stage (SHINKE and SHIGENAGA 1933); also the distribution of point unions undergoes significant changes. Finally, at the end of prophase the chromosomes show no response to X-rays. All of these changes in the reactions of the chromosomes reflect the changes which are occurring in their physical and chemical state.

Of the various constituents of the chromosomes DNA at least does not increase in amount during prophase. Recent evidence indicates that its synthesis is completed during interphase (WALKER and YATES 1952; HOWARD and PELC 1952; SWIFT 1953; VENDRELY 1955; cf. however CASPERSON 1939; RIS 1947). Thus changes in DNA content will not account for the changing reactions of the chromosomes. On the other hand there is evidence of changes in the RNA content of the chromosomes during prophase.

RNA has been described as a constituent of normal chromosomes (CASPERSON and SCHULTZ 1938; BRACHET 1941, 1947; see review by THORELL 1955), and of "residual chromosomes" (MIRSKY and RIS 1947). It has also been shown recently that the amount of RNA, probably as RNA-protein, on mitotic chromosomes increases during prophase (KAUFMANN et al. 1947; KAUFMANN, McDONALD and GAY 1948; JACOBSON and WEBB 1951, 1952). This conclusion, based on results from the use of double-staining techniques combined with enzyme treatments, is supported by *in vitro* experiments on dye specificity and by the use of highly purified RNA-ase (see also McDONALD 1947), which is known to attack RNA (DAVIDSON 1947, 1953). A similar change in staining properties during prophase has been found in meiotic chromosomes of a grasshopper (SRIVASTAVA 1954).

The results from experiments combining double-staining techniques with the use of RNA-ase indicate that the changes in staining found during prophase represent a real change in the chemical make-up of a chromosome, consequent upon the uptake of RNA. Furthermore, JACOBSON and WEBB's description (1952) of how stains for RNA appear first at localised points on a chromosome and are then taken up at other points suggests a mechanical basis for the differential and changing sensitivity of different chromosomes to X-rays during prophase.

Evidence that RNA is shed into the cytoplasm also shows that a process of incorporation must occur at an earlier stage of mitosis. KAUFMANN et al. and JACOBSON and WEBB (*loc. cit.*) showed that anaphase chromosomes lose their ability to take up stains for RNA at the same time as the cytoplasm shows an increased basophilia; and DAVIS (1952) found that the region between the two groups of anaphase chromosomes gave a higher absorption in the ultra-violet than did the surrounding



cytoplasm. In Lepidoptera, anaphase chromosomes may actually decrease in volume due to the process of "chromatin elimination" (RIS and KLEINFELD 1952; other references on spindle mid-bodies in WHITE 1952).

If the RNA on the chromosome was present in a relatively low state of polymerisation its loss at anaphase might be made easier. KURNICK (1947) has suggested that methyl-green/pyronin distinguishes between DNA and RNA because of their different degrees of polymerisation; DNA, in a highly polymerised state, takes up methyl-green, while affinity for pyronin is shown by lower polymers, i. e. RNA. The actual state of RNA while it is a chromosome constituent will be influenced by association with other molecules. It may be present as an RNA-protein complex (JACOBSON and WEBB, loc. cit.) or as a DNA-RNA-protein complex (KAUFMANN et al. 1951-1955). Whatever its state, the RNA remains open to reaction with RNA-ase (KAUFMANN et al., and JACOBSON and WEBB loc. cit.; KAUFMANN and DAS 1955; DAS et al. 1955). Indeed, the fact that RNA-ase is able to attack chromosomes shows that RNA is present. Furthermore, the extent to which the chromosome is changed indicates not only the importance of RNA for chromosome structure but also the way in which it is combined with other constituents.

RNA-ase has two effects on resting nuclei: it makes them sensitive to subsequent treatment with spleen DNA-ase (CATCHESIDE and HOLMES 1947), and it reduces the amount of methyl-green but not Feulgen stain which is taken up by DNA (KAUFMANN, McDONALD and GAY 1951). In dividing nuclei the main effects of RNA-ase are on chromosome coiling and stickiness, though it also affects the spindle. RNA-ase has not been found to induce reciprocal translocations in *Drosophila melanogaster*; and although chromosome bridges and fragments are found in roots of *Allium cepa* they cannot be attributed solely to the action of the RNA-ase. In its action on complexes containing RNA this enzyme also releases DNA-ase, an enzyme which may induce chromosome breakage. Thus RNA does not appear to be an essential part of the structure of the resting stage chromosome but plays a part in the prophase chromosome.

It now seems established that the chemical composition of the chromosomes undergoes marked changes during prophase. At the same time, changes occur in the physical state of the chromosomes and their reactions to irradiation. These changes, I would suggest, depend upon previous chemical changes.

Other substances which may be involved in the changes in chromosome structure and behaviour include lipids (SHINKE and SHIGENAGA 1933; COHEN 1949), phospholipids (LA COUR 1955), and perhaps metallic ions, for example calcium, which is thought to affect DNA structure (MAZIA 1952). Phospholipids, like RNA, occur in nucleoli (SNOAD 1955).

### 6. *The effect of the nucleolus*

Nuclei lacking nucleolar organisers may be produced experimentally. They do not develop nucleoli and, significantly, they fail to divide (LA COUR 1952; McLEISH 1952). Extra nucleolar organisers are also effective during resting stage. They exert a protective effect against irradiation (LA COUR 1952; McLEISH 1956).

Nucleoli are found at new sites on the chromosomes following a heat shock (JAIN 1957). Bivalents without nucleoli are then found to be retarded during prophase; they are less contracted than bivalents with nucleoli. The nucleolus, it seems, supplies material which is essential for the development of the chromosomes during prophase. In JAIN's experiment this material never passes to non-nucleolar chromosomes; we must assume, however, that it does so under normal conditions.

In meiotic prophase in *Vicia*, X-rays affect chiasma formation in S chromosomes when M chromosomes no longer respond (MARQUARDT 1951). Similarly, in mitotic prophase, the M chromosome is apparently protected. These results suggest that M chromosomes are protected because they receive material from the nucleolus before it is received by S chromosomes or, perhaps, at a faster rate.

Point unions have been found in aneuploid endosperm (BROCK 1955). The presence of other spontaneous abnormalities indicated that they occurred under conditions of internal unbalance. Under these conditions, point unions occurred mainly in the nucleolar chromosome; non-nucleolar chromosomes showed few effects. This is in distinct contrast to the distribution of induced point unions. It suggests that internal unbalance and nucleolar abnormality were related.

It is evident, from various lines of evidence, that the nucleolus plays an important part in the life of the nucleus. It appears to contain materials, probably including RNA, which are essential for the development of the chromosome during prophase. The state of the chromosome and its reactions now seem related. Thus, the protective effect of the nucleolus against X-rays may well be determined by its contributions to the composition of the chromosome. Though the nature of point unions has not been defined, these studies of their distributions at different times and after different treatments have shown point unions to be indicators of the physiological changes which occur in prophase chromosomes.

**Acknowledgments.** I am grateful to Professor C. D. DARLINGTON for his help during the course of this work and in the preparation of the manuscript; to Mr L. F. LA COUR, who drew my attention to point unions and to Mr J. F. SCOTT for advice on statistics; also to the Agricultural Research Council for the award of a scholarship.

### Summary

1. Mitotic prophases of *Vicia faba* (2x) and *Hyacinthus orientalis* (3x) were irradiated. Two effects were found: (i) interstitial union of chromatids mostly at homologous points, rarely at non-homologous points. (ii) terminal union of chromatids. Interstitial unions are more frequent than terminal unions in all fixations.

2. Both these types of unions are described as point unions. They are recorded at anaphase. They disappear at telophase owing to breakage at the union or in a chromatid arm.

3. Point unions do not occur in certain proximal regions on either side of the centromere. In *Hyacinthus* the length of these proximal regions is about 0.025 of the chromosome arm in L, M and S chromosomes. In *Vicia*, these regions are 0.1 of the long arms in M and S chromosomes.

4. In *Hyacinthus*, induced point unions were disproportionately frequent in L chromosomes but also occurred in M and S chromosomes.

5. In *Vicia*, point unions induced by X-rays:

(i) Occur mainly in the central third of the long arms of chromosomes. In the short arm of S chromosomes all unions are terminal.

(ii) Are equally frequent in the two arms of the nucleolar M chromosome.

(iii) Occur in M and S chromosomes in proportion to chromosome length at the beginning and end of prophase.

(iv) Occur in M chromosomes in a lower frequency than expected in the middle of prophase.

6. *Vicia* was also treated with solutions of 8-ethoxycaffeine (EOC). This induces chromosome breaks during the resting stage and point unions during prophase. At both stages M chromosomes are affected frequently and disproportionately to chromosome length; perhaps because they include the nucleolar organiser.

7. Since point unions, terminal and interstitial, and resting stage breaks are induced by the same physical and chemical treatments it is concluded they are related in mode of causation.

8. Point unions may involve sub-chromatid breakage and reunion. But  $X_2$  divisions (4xmitosis) showed no consequences of sub-chromatid effects. This indicates either that breakage involved whole chromatids, or that exchange of sub-chromatid fractions is always reciprocal.

### References

- D'AMATO, F. D.: The chromosome breaking activity of chemicals as studied by the *Allium cepa* test. Publ. Staz. zool. Napoli **22**, Suppl., 158—170 (1950). — D'AMATO, F. D., and M. G. D'AMATO-AVANZI: The chromosome breaking effect of coumarin derivatives in the *Allium* test. Caryologia (Pisa) **6**, 134—150 (1954). — AUERBACH, C.: Chemical mutagenesis. Biol. Rev. **24**, 355—391 (1949). — AVANZI, M. G.: Frequenza e tipi di aberrazione cromosomiche indotte da alcuni derivati

- della naftalene. *Caryologia* (Pisa) **3**, 165—180 (1950). — BARBER, H. N.: The suppression of meiosis and the origin of diplochromosomes. *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B* **128**, 170—185 (1940). — BEADLE, G. W.: A gene for sticky chromosomes in *Zea mays*. *Z. Vererbungslehre* **63**, 195—217 (1932). — BIRD, M. J., and O. G. FAHMY: Cytogenic analysis of the action of carcinogens and tumour inhibitors in *Drosophila melanogaster*. I. 1:2, 3:4 diepoxybutane. *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B* **140**, 556—576 (1953). — BRACHET, J.: La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'Amphibiens en voie de développement. *Archives de Biol.* **53**, 207—257 (1941). — Discussion. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **12**, 145 (1947). — BROCK, R. D.: Chromosome balance and endosperm failure in hyacinths. *Heredity* (Lond.) **9**, 199—222 (1955). — CALLAN, H. G.: Heterochromatin in *Triton*. *Proc. Roy. Soc. Lond., Ser. B* **130**, 324—335 (1942). — CARLSON, J. G., and N. HARRINGTON: X-ray induced stickiness of the chromosomes of the *Chortophaga* neuroblast in relation to dose and mitotic stage at treatment. *Radiation Research* **2**, 84—90 (1955). — CATCHESIDE, D. G., and B. HOLMES: The action of enzymes on chromosomes. *Symposia Soc. Exper. Biol.* **1**, 226—231 (1947). — CASPERSSON, T.: Über die Rolle der Desoxyribosenukleinsäure bei der Zellteilung. *Chromosoma* **1**, 147—156 (1939). — CASPERSSON, T., and J. SCHULTZ: Nucleic acid metabolism of the chromosomes in relation to gene reproduction. *Nature* (Lond.) **142**, 294—295 (1938). — COHEN, I.: The use of Sudan Black B in the study of heterochromatin in certain plant nuclei. *Biol. Bull.* **97**, 236 (1949). — CONGER, A. D.: X-ray sensitivity of the stages of mitosis. *Amer. J. Bot.* **34**, 582 (1949). — CROUSE, H. V.: X-ray breakage of lily chromosomes at 1st meiotic metaphase. *Science* (Lancaster, Pa.) **119**, 485—487 (1954). — DARLINGTON, C. D.: Physical and chemical breakage of chromosomes. *Pubbl. Staz. zool. Napoli* **22**, Suppl., 1—11 (1950). — DARLINGTON, C. D., J. B. HAIR and R. HURCOMBE: The history of the garden hyacinths. *Heredity* (Lond.) **5**, 233—252 (1951). — DARLINGTON, C. D., and P. C. KOLLER: The chemical breakage of chromosomes. *Heredity* (Lond.) **1**, 187—221 (1947). — DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: Nucleic acid starvation of chromosomes in *Trillium*. *J. Genet.* **40**, 185—213 (1940). — Chromosome breakage and the nucleic acid cycle. *J. Genet.* **46**, 180—267 (1945). — DAS, N. K., C. GHOSH, B. P. KANFURANN and G. R. KERSH: Release of desoxyribonuclease by onion roots growing in solutions of ribonuclease. *Amer. J. Bot.* **42**, 949—953 (1955). — DAVIDSON, D.: Unpublished. — DAVIDSON, J. N.: The distribution of nucleic acids in tissues. *Symposia Soc. Exper. Biol.* **1**, 77—85 (1947). — The biochemistry of the nucleic acids. London: Methuen 1953. — DAVIES, H. G.: The ultra-violet absorption of living chick fibroblasts during mitosis. *Exper. Cell Res.* **3**, 453—461 (1952). — DEUFEL, J.: Untersuchungen über den Einfluß von Chemikalien und Röntgenstrahlen auf die Mitose von *Vicia faba*. *Chromosoma* **4**, 239—272 (1951). — DU BOIS, A. M.: Chromosome behaviour during cleavage in the eggs of *Sciara coprophila* in relation to the problem of sex determination. *Z. Zellforsch.* **19**, 595—614. (1933). — FORD, C. E.: Chromosome breakage in nitrogen mustard treated *V. faba* root tip cells. *Proc. 8. Internat. Congr. Genetics. Hereditas* (Lund) Suppl. **1949**, 570. — GEYER-DUSZYNSKA, I.: X-ray induced fragmentation of salivary gland chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Zoologica Poloniae* **6**, 250—282 (1955). — GOTTSCHALK, W.: Untersuchungen am Pachytän normaler und röntgenbestrahlter Pollenmutterzellen von *Solanum lycopersicum*. *Chromosoma* **4**, 298—314 (1951). — GUSTAFSSON, A.: Studies on the experimental control of the mutation process. *Radiobiology Symp.* **1954**, 282—284. — HAQUE, A.: The irradiation of meiosis in *Tradescantia*. *Heredity* (Lond.) **6**, Suppl., 57—75 (1952). — HOWARD, A., and S. R. PELC: Synthesis of DNA in normal and irradiated cells. *Heredity* (Lond.) **6**, Suppl., **1952**, 261—273. — JACOBSON, W., and M. WEBB: The two types of nucleic acid during mitosis. *J.*

of *Physiol.* **112**, 2—4P (1951). — Nucleoproteins and cell division. *Endavour* **11**, 200 (1952). — JAIN, H. K.: Inactivation of nuclei by high temperature in meiosis in *Lolium*. *Heredity* (Lond.) **11**, 23—36 (1957). — KAUFMANN, B. P.: Distribution of induced breaks along the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **25**, 571—576 (1939). — KAUFMANN, B. P., et al.: *Carnegie Inst. Annual Reports of Director of Genetics. 1951—1955.* — KAUFMANN, B. P., and N. K. DAS: The role of ribonucleoproteins in the production of mitotic abnormalities. *Chromosoma* **7**, 19—38 (1955). — KAUFMANN, B. P., M. R. McDONALD and H. M. GAY: Enzymatic degradation of RNA proteins of chromosome, cytoplasm and nucleoli. *Nature* (Lond.) **162**, 814 (1948). — The distribution and interrelation of nucleic acids in fixed cells as shown by enzymatic hydrolysis. *J. Cellul. and Comp. Physiol.* **38**, Suppl., 71—94 (1951). — KAUFMANN, B. P., M. R. McDONALD, N. M. GAY, K. WILSON and R. WYMAN: *Carnegie Inst. Year Book* **46**, 141 (1947). — KIHLMAN, B.: A survey of purine derivations as inducers of chromosome changes. *Hereditas* (Lund) **38**, 115—127 (1952). — Induction of chromosome changes with purine derivatives. *Symbolae bot. Uppsalienses* **11**, 4 (1952). — Chromosome breakage in *Allium* by 8-EOC and X-rays. *Exper. Cell Res.* **8**, 345—368 (1955). — KIHLMAN, B., and A. LEVAN: Localized chromosome breakage in *V. faba*. *Hereditas* (Lund) **37**, 382—388 (1951). — KLINGSTEDT, H.: Taxonomic and cytological studies on grasshopper hybrids. *J. Genet.* **37**, 389—420 (1939). — KOLLER, P. C.: The cytological effects of irradiation at low intensities. *Heredity* (Lond.) **6**, Suppl., 5—22 (1952). — KURNICK, B.: Discussion. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 141 (1947). — LA COUR, L. F.: The physiology of chromosome breakage and reunion in *Hyacinthus*. *Heredity* (Lond.) **6**, Suppl., 163—179 (1952). — *Ann. Rep. John Innes Horticult. Instit.* **46**, 19 (1955). — LA COUR, L. F., and A. RUTISHAUSER: X-ray breakage experiments with endosperm. I. Sub-chromatid breakage. *Chromosoma* **6**, 696—709 (1954). — LAMM, R.: Cytological studies on inbred rye. *Hereditas* (Lund) **31**, 217—240 (1936). — LEVAN, A., and J. H. TJIO: Induction of chromosome fragmentation by phenols. *Hereditas* (Lund) **34**, 453—480 (1948). — Penicillium in the *Allium* test. *Hereditas* (Lund) **37**, 306—324 (1951). — LEWIS, D., and L. CROWE: Theory of reversible mutations. *Nature* (Lond.) **172**, 501 (1953). — MANTON, I.: Comments on chromosome structure. *Nature* (Lond.) **155**, 471—473 (1945). — The spiral structure of chromosomes. *Biol. Rev.* **25**, 486—508 (1950). — MARQUARDT, H.: Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die Chiasmatafrequenz in der Meiosis von *Vicia faba*. *Chromosoma* **4**, 232—238 (1951). — MAZIA, D.: Physiology of the cell nucleus. In: *Modern Trends in Physiology and Biochemistry*, pp. 77—122. New York: Academic Press 1952. — McDONALD, M., et al.: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 27 (1947). — McLEISH, J.: The action of maleic hydrazide on *Vicia*. *Heredity* (Lond.) **6**, Suppl., 125—147 (1952). — Radiation sensitivity and the mitotic cycle in *Vicia faba*. *Nature* (Lond.) **175**, 890—891 (1955). — MIRSKY, A. E., and H. RIS: The chemical composition of isolated chromosomes. *J. Gen. Physiol.* **31**, 7—18 (1947). — MÜNTZING, A.: Cytological studies of extra fragment chromosomes in rye. III. The mechanism of non-disjunction at the pollen mitosis. *Hereditas* (Lund) **32**, 97—112 (1946). — MÜNTZING, A., and S. ARDIK: Cytological disturbances in the first inbred generation of rye. *Hereditas* (Lund) **34**, 485—509 (1948). — NEBEL, B. R.: Chromosome structure. XII. Further radiation experiments with *Tradescantia*. *Amer. J. Bot.* **24**, 365—372 (1937). — OEHLKERS, F.: Chromosome breaks influenced by chemicals. *Heredity* (Lond.) **6**, Suppl., 95—105 (1952). — ÖSTERGREN, G.: An efficient chemical for the induction of sticky chromosomes. *Hereditas* (Lund) **30**, 213—216 (1944). — Chromosome bridges and breaks by coumarin. *Bot. Not. (Lund)* **4**, 376—380 (1948). — ÖSTERGREN, G., and T. WAKONIG: True or apparent sub-chromatid breakage and the induction of labile states in cytological chromosome loci. *Bot. Not. (Lund)* **10**, 357—375 (1954). — REES, H.:

Centromere control of chromosome splitting and breakage. *Heredity* (Lond.) **6**, Suppl., 235—245 (1952). — REVELL, S. H.: Chromosome breakage by X-rays and radiomimetic substances in *Vicia*. *Heredity* (Lond.) **6**, Suppl., 107—125 (1952). — RIS, H.: The composition of chromosomes during mitosis and meiosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **12**, 158—160 (1947). — RIS, H., and R. KLEINFELD: Cytochemical studies on the chromatin elimination in *Solenobia* (*Lepidoptera*). *Chromosoma* **5**, 363—371 (1952). — SAX, K., and E. D. KING: An X-ray analysis of chromosome duplication. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **41**, 150—155 (1955). — SAX, K., et K. MATHER: An X-ray analysis of progressive chromosome splitting. *J. Genet.* **37**, 483—490 (1939). — SHINKE, N., and M. SHIGENAGA: A histochemical study of plant nuclei in rest and mitosis. *Cytologia* (Tokyo) **4**, 189—221 (1933). — SLIZYNSKI, B. M.: Partial breakage of salivary gland chromosomes. *Genetics* **35**, 279—287 (1950). — SNOAD, B.: The influence of temperature upon the nucleoli of *Tradescantia*. *Exper. Cell Res.* **8**, 554—557 (1955). — SRIVASTAVA, M. D. L.: Studies on the structure of the chromosomes of *Crotogonus incertus* BOLIVAR. *J. Genet.* **52**, 480—493 (1954). — SWANSON, C. P.: Differential sensitivity of prophase pollen tube chromosomes to X-rays and ultraviolet radiation. *J. Gen. Physiol.* **26**, 485—494 (1943). — X-rays and ultra-violet studies on pollen tube chromosomes. II. The quadripartite structure of the prophase chromosomes of *Tradescantia*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **33**, 229—232 (1947). — SWIFT, H. N.: Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins. *Internat. Rev. Cytology* **2**, 1—71 (1953). — THORELL, B.: Nucleic acids in chromosomes and mitotic divisions. In: *The Nucleic Acids*, vol. II, pp. 181—198. New York: Academic Press 1955. — VENDRELY, R.: The desoxyribonucleic acid content of the nucleus. In: *The Nucleic acids*, vol. II, pp. 155—180. New York: Academic Press 1955. — WALKER, P. M. B., and H. B. YATES: Ultra violet absorption of living cell nuclei during growth and division. *Symposia Soc. Exper. Biol.* **6**, 265—276 (1952). — WALTERS, M. S.: A study of pseudobivalents in meiosis of two interspecific hybrids of *Bromus*. *Amer. J. Bot.* **41**, 160—171 (1954). WARMKE, H. E.: Cytology of the Pacific coast trilliums. *Amer. J. Bot.* **24**, 376 bis 383 (1937). — WATSON, J. D., and F. N. C. CRICK: Molecular structure of nucleic acid. *Nature* (Lond.) **171**, 737—781 (1953). — DNA structure and its genetical implication. *Nature* (Lond.) **171**, 964—967 (1953). — WHITE, M. J. D.: *The Chromosomes*. London: Methuen 1942. — WHITING, A. R., and W. E. MURPHY: Differences in response of irradiated eggs and spermatozoa of *Habrobracon* to anoxia. *J. Genet.* **54**, 297—303 (1956).

Dr. DOUGLAS DAVIDSON, The University of Oxford, Botany Department,  
South Parks Road, Oxford, (England)

From the Department of Zoology and Comparative Anatomy, University College  
of S. Wales and Monmouthshire, Cardiff

## THE CHROMOSOMES OF ZOOPARASITES

### II. OSWALDOCRUZIA FILIFORMIS (NEMATODA: TRICHOSTRONGYLIDAE)

By

BERNARD JOHN

With 24 Figures in the Text

(Eingegangen am 19. August 1957)

#### 1. Introduction

The classical studies on zooparasitic nematodes suggest that these organisms are interesting and favourable material for karyological research. Chromatin diminution, for instance, was first described in *Ascaris megalcephala* (BOVERI 1887) and it was in this species too that the first evidence was obtained for multiple centric activity in animals (WHITE 1936). Despite this there has been little attempt to extend the field of study in this group in recent years although it seems probable that such an extension might yield significant contributions to cytological knowledge.

#### 2. Material and technique

*Oswaldocruzia filiformis* is a unisexual intestinal endoparasite of the toad (*Bufo bufo bufo*). Material for the present investigation was obtained from toads taken locally during mating. The reproductive systems of the parasites were dissected out in Ringer B (DARLINGTON and LA COUR 1942) and fixed in a 1:3 acetic-alcohol mixture prior to squashing in acetic-orcein.

#### 3. The karyotype

No pre-meiotic mitoses were encountered in either sex. First meiotic divisions in the male show five bivalents and a univalent (Figs. 6, 7, 8, 10 and 15); the egg contains six bivalents at this stage (Figs. 1 and 2). Cleavage mitoses of the fertilised egg have either eleven (Fig. 23) or twelve (Fig. 24) chromosomes. The diploid number in this species is thus 12 ♀, 11 ♂ and, like a majority of nematode species, *O. filiformis* has an XX ♀, XO ♂ sex chromosome system.

#### 4. Behaviour of the sex univalent

The unpaired X of the male is heterochromatic and it is over-charged at the onset of meiosis. Its charge diminishes during first prophase and by the end of diakinesis it can be seen to have reproduced into two



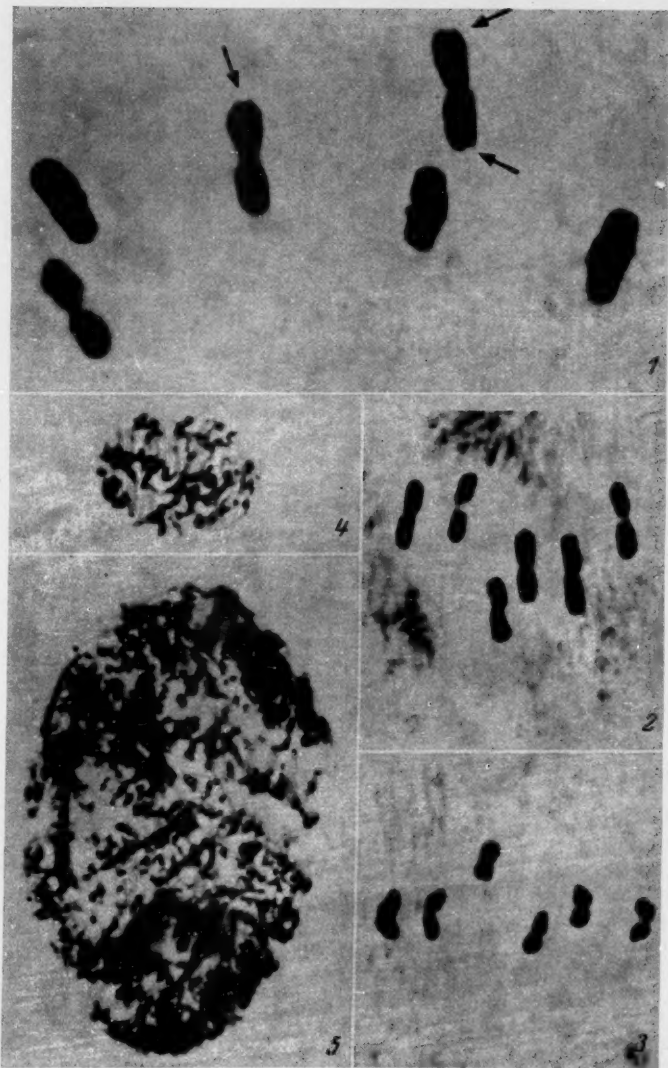
chromatids (Fig. 10). Congression of the X may be slightly delayed but it invariably lies near the equator at first metaphase and it may lie on it. At anaphase the X lags on the spindle (Fig. 16): its subsequent behaviour, however, is variable. In some cells it does not divide but passes unmodified to one pole (Fig. 17). In others it may divide whilst lagging (Fig. 18) so that both telophase groups contain an X. Finally in rare instances a "sticky" bridge develops between the separating sex chromatids (Fig. 19).

Non-disjunction of the X at the first division gives rise to daughter nuclei, the one with and the other without (Fig. 20) an X; and since in the former the X has not yet divided it divides at second metaphase and may then do so in advance of the autosomes (Fig. 21). Disjunction of the X at first anaphase produces identical daughter nuclei both of which contain a sex chromatid which, because it is single, does not divide again at the second division (Fig. 22).

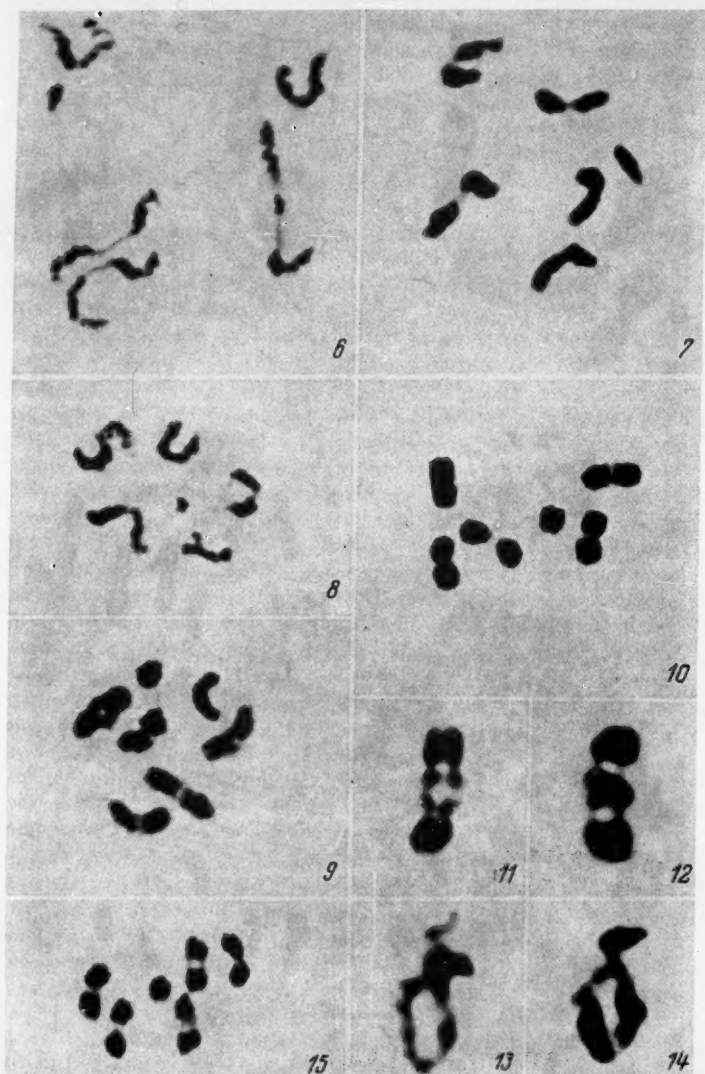
Such a lability in the behaviour of a sex univalent is not common; for this reason a discussion of its cause is indicated. XY:XX sex chromosome systems are not stable in the evolutionary sense but undergo continuous disintegration and replacement (DARLINGTON 1939). One of the results of this instability has been the elimination of the Y leading to the development of XO:XX systems. Such a loss, apart from upsetting the genic balance of the heterozygous sex, may create a meiotic situation to which the centromere of the unpaired X will not be adapted since there will no longer be an homologous partner with which it can co-orientate at first metaphase. This in turn may necessitate radical changes in the mechanical behaviour of the X. The immediate result of the loss of the Y will however vary, depending upon the intrinsic mechanical properties of the univalent so formed. But the X is unlikely to remain as it began: it will inevitably evolve through the selection of genotypically controlled variation in its behaviour (cf. REES 1955). In this way the behaviour of the univalent may be expected to become adapted to the particular meiotic system in which it segregates.

The value of *Oswaldocruzia* is that it demonstrates an XO system that has probably only recently evolved and which therefore has not yet attained a state of adaptive mechanical stability. In this species it seems probable that the centromere of the X divides during first prophase so that it is invariably structurally double by first metaphase. Division or non-division of the X at anaphase would then depend not on the time of division of the centromere of the X, as earlier workers have suggested (NIGON 1949, ÖSTERGREN 1951), but on the time that the divided centromere starts to behave as a double unit. The development of "sticky" bridges (Fig. 19) indicates that there may be variability in the degree of charging and hence of the coiling of the X chromatids.

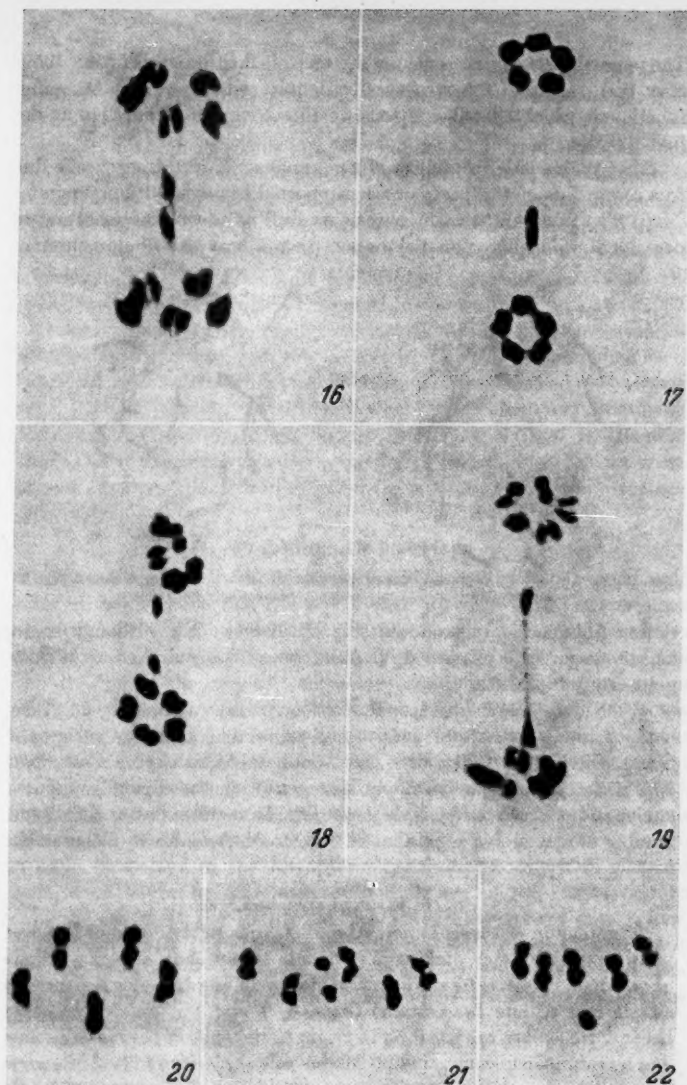




Figs. 1—5. All photomicrographs. 1: First metaphase of egg ( $n=6$ ), note appearance of centric attenuations in the two uppermost bivalents ( $\times 3250$ ). 2: Early first anaphase of egg ( $\times 2000$ ). 3: Second metaphase of egg ( $\times 3000$ ). 4 and 5: Two nuclei of the investing epithelium of the male gonad to show size variation caused by endo-mitosis (both  $\times 1500$ )



Figs. 6—15. All photomicrographs of male nuclei. 6: Late diplotene, chiasmata already terminalised. ( $\times 2000$ ). 7 and 8: Early diakinesis ( $\times 2000$ ). 9: Pro-metaphase in a nucleus containing an extra X univalent ( $\times 2000$ ). 10: Pro-metaphase with X now visibly double ( $\times 2000$ ). 11 and 12: Rod bivalents showing interstitial associations ( $\times 4000$ ). 13 and 14: Ring bivalents showing interstitial associations ( $\times 4000$ ). 15: First metaphase ( $\times 2000$ ).

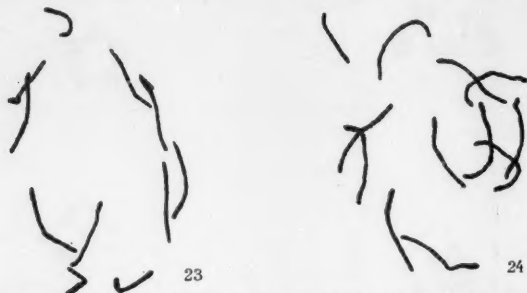


Figs. 16—22. All photomicrographs ( $\times 2000$ ) of male nuclei. 16: First anaphase, X lagging on the spindle: note centric attenuations in both X chromatids. 17: First anaphase, lagging X moving undivided to lower pole. 18: First anaphase, lagging X divided. 19: First anaphase, lagging X divided but sister chromatids associated by a "sticky" bridge. 20: Second metaphase, no X. 21: Second metaphase, X chromosome dividing precociously. 22: Second metaphase, non-congressed X chromatid

The possibility of centric screening by the coiled chromatids (JOHN 1957) may then result in the structurally double centromere not becoming functionally double until it is too late to accomplish disjunction at the first division.

That the meiotic instability of the unpaired X in this species is due to a recent loss of the partner Y is supported by two additional points:

(i) The X is unstable in mitosis as well as in meiosis resulting in occasional pre-meiotic non-disjunction. In this way extra heterochroma-



Figs. 23 and 24. Mitotic pro-metaphase of cleavage divisions in eggs with eleven (Fig. 23) and twelve (Fig. 24) chromosomes respectively ( $\times 1000$ )

tic sex univalents are produced (Fig. 9). The two X's, although homologous, do not pair as they do in the ♀ presumably as a result of their precocity (cf. MAKINO 1939).

(ii) NIGON (1949) has described a comparable variability in X behaviour in the rare males which he obtained in laboratory cultures of the free living hermaphrodite nematodes *Rhabditis elegans* and *Rhabditis dolichura*. In the hermaphrodite condition the diploid number is twelve in both male and female germ cells. In males however the diploid number is eleven and the unpaired chromosome can divide either at the first or at the second division.

##### 5. Bivalent structure

Zygotene in the male is normal and there is no evidence of localised pairing. Despite this diakinesis bivalents rarely show visible evidence of previous chiasma formation: a majority of the homologues forming simple end to end associations (Figs. 6, 7 and 8). This is probably because chiasmata are localised in origin to the ends of the chromosomes and so terminalise very rapidly. Moreover a majority of bivalents must form only one chiasma since their homologues are most frequently associated at one end only. Association may however involve both ends (Figs. 13 and 14) and in some instances a subterminal association of arms is found (Figs. 11 to 14). Localisation and rapid terminalisation

may be the rule in the female too. This condition is by no means unique; OKSALA (1947) has described a meiosis in the pentatomid *Dolycoris* in which there is an extremely rapid terminalisation relative to chromosome contraction which also leads to a predominance of terminal associations.

In most respects the morphology and behaviour of the bivalents in male *Oswaldocruzia* show a similarity to that described by NIGON and BRUN (1955) in the female of *Rhabditis elegans*. These workers, however, considered the bivalents there to be non-chiasmate and proposed an alternative scheme to account for bivalent association. Despite the undoubted occurrence of non-chiasmate meioses (JOHN and LEWIS 1957) the maintenance of homologous associations through chiasma formation is still the rule rather than the exception. For this reason instances of supposed autosomal pairing without chiasma formation need to be treated with extreme caution, particularly where unqualified or undefinable forces are required to account for the meiotic association. In *Rhabditis elegans* as in *Oswaldocruzia* the sequence of events and the end result appear equally explicable in terms of the resolution of distally localised chiasmata.

#### 6. Centromeric behaviour

The centromere of *Oswaldocruzia* is fully localised but in some male and female bivalents (Fig. 1) it is possible to distinguish two attenuations at the centric region during first metaphase. This gives an appearance reminiscent of that which led LIMA-DE-FARIA (1956) to conclude that the division of the meiotic centromere may start at first metaphase and be completed by first anaphase. The production of two functional centromeres would then result in the development of two parallelly placed chromosome fibres. The possibility of centromeric division anteceding second metaphase has also been recently acknowledged by DAVIES (1956).

Centric attenuation occurs at second metaphase too in both the male and the female (Figs. 3, 20, 21 and 22). COOPER (1951) reported a comparable behaviour in the mecopteran *Boreus* and suggested that its occurrence might be correlated with a failure of the chromatids to separate freely at the time when the kinetic component was active. If this applies to *Oswaldocruzia* it could be indicative of a non-centric association of sister chromatids, an association which LIMA-DE-FARIA (1956) has found to be common in species where the centromere divides before second metaphase.

#### 7. Endopolyploidy

Reproduction of the chromosomes need not always be followed by division of the nucleus. Indeed in insects the growth of differentiated tissues commonly involves such an endo-mitosis (WHITE 1954). Repetitive endo-mitosis naturally leads to the formation of giant endopolyploid

nuclei. Such nuclei (Fig. 5) occur in the investing epithelium of the gonads of both sexes in *Oswaldocruzia*.

### Summary

1. *Oswaldocruzia filiformis* has ten autosomes in its diploid complement. In addition males possess a sex (X) univalent while females have two such chromosomes.

2. Segregation of the unpaired X in the male is variable. It may divide at first anaphase or at the second but not at both. This lability in behaviour of the X together with its occasional pre-meiotic non-disjunction is taken to indicate that the XO system in this species is of recent origin.

3. Chiasmata are probably localised distally in origin in both sexes and so terminalise very rapidly. For this reason one rarely finds interstitial associations persisting to first metaphase. Moreover rod bivalents are much more frequent than rings.

4. The appearance of the centromere at first metaphase and the attenuation of this region at second metaphase suggest that the meiotic centromere in this species may divide before first anaphase.

5. The nuclei of the epithelium which invests the gonads are endopolyploid and originate by endo-mitosis.

### Literature cited

- BOVERI, T.: Über Differenzierung der Zellkerne während der Furchung des Eies von *Ascaris megalocephala*. Anat. Anz. **2**, 688—693 (1887). — COOPER, K. W.: Compound sex chromosomes with anaphasic precocity in the male mecopteran *Boreus brumalis* FITCH, J. of Morph. **89**, 37—57 (1951). — DARLINGTON, C. D.: The evolution of genetic systems. Cambridge: University Press 1939. — DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: The handling of chromosomes. London: Allen and Unwin 1942. — DAVIES, D. R.: The structure of the centromere in relation to metabolic activity. Chromosoma **8**, 221—228 (1956). — JOHN, B.: XY-segregation in the crane fly *Tipula maxima* (Diptera: Tipulidae). Heredity (Lond.) **11**, 209—215 (1957). — JOHN, B., and K. R. LEWIS: Studies on *Periplaneta americana*. I. Experimental analysis of male meiosis. Heredity (Lond.) **11**, 1—9 (1957). — LIMA-DE-FARIA, A.: The role of the kinetochore in chromosome organisation. Hereditas (Lund) **42**, 85—160 (1956). — MAKINO, S.: On the tetraploid spermatocytes produced by irradiation in *Podisma mikado* (Acrididae). Jap. J. Genet. **15**, 80—82 (1939). — NIGON, V.: Modalités de la reproduction et déterminisme du sexe chez quelques nématodes libres. Ann. Sci. natur. (Paris) **11**, 1—132 (1949). — NIGON, V., et J. BRUN: L'évolution des structures nucléaires dans l'ovogenèse de *Caenorhabditis elegans* Maupas 1900. Chromosoma **7**, 129—165 (1955). — OKSALA, T.: On the formation of bivalents in some pentatomids (Hemiptera). Hereditas (Lund) **33**, 110—118 (1947). — ÖSTERGREN, G.: The mechanism of co-orientation in bivalents and multivalents. The theory of orientation by pulling. Hereditas (Lund) **37**, 85—156 (1951). — WHITE, M. J. D.: The chromosome cycle of *Ascaris megalocephala*. Nature (Lond.) **137**, 783 (1936). — Animal cytology and evolution. Cambridge: University Press 1954.

B. JOHN, Dept. of Zoology, Univ. College of S. Wales and Monmouthshire, Cardiff, Wales (England)

From the Botany Department, The University of Oxford,  
and the Zoology Department, University College of Cardiff

## THE ORGANISATION AND EVOLUTION OF THE SEX MULTIPLE IN *BLAPS MUCRONATA*

By

K. R. LEWIS and B. JOHN

With 20 Figures in the Text

(Eingegangen am 6. September 1957)

### A. Introduction

The maintenance of sex chromosome systems depends on two conditions in the heterozygous sex: the one genetical, the other mechanical. Firstly, the occurrence of differential segments. Secondly, preferential segregation, so that the X component and Y component, if present, behave as units in heredity. This second condition is more difficult to satisfy when there is a multiple sex chromosome system but a number of mechanisms have been evolved for this purpose. These include:

1. Alternate segregation of multiples; here the heterozygous sex is a structural heterozygote and the sex chromosomes are associated by chiasmata (CALLAN and JACOBS 1957, COOPER 1946, SHARMAN and BARBER 1952).

2. A special spindle structure and centromere cycle (DARLINGTON 1939a).

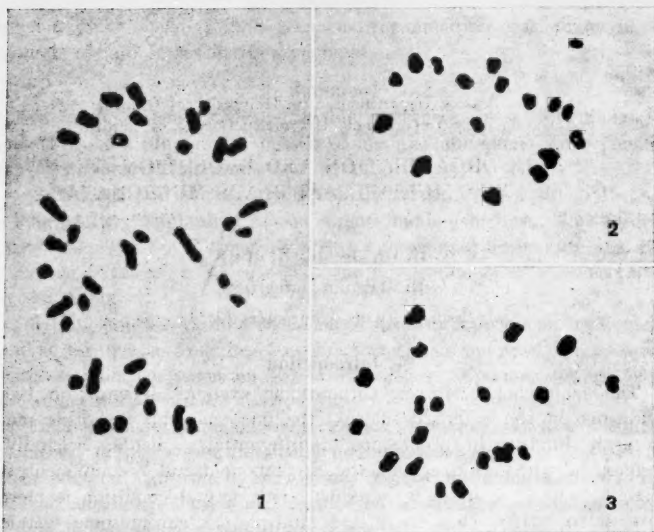
3. Continuous polarisation (REVELL 1947), and

4. "Distance pairing" (PIZA 1946).

Many of the multiple sex chromosome mechanisms in animals however have not been explained satisfactorily (cf. WHITE 1954). This is true of those in the *Coleoptera*. Most beetles have an XX:XY or XX:XO sex chromosome system (SMITH 1953) but there are two exceptional genera, *Blaps* (GUÉNIN 1949, 1953) and *Vicindela* (GUÉNIN 1952, SMITH and EDGAR 1954). In both of these, all the species seem to possess multiple sex chromosome systems.

The present account deals with the cellar beetle *Blaps mucronata* (*Coleoptera: Tenebrionidae*). In many respects the mechanism in this species is different from any hitherto described (but cf. PAYNE 1912, 1916). The sex multiple is maintained partly by chiasma formation and partly by a non-homologous association involving a nucleolus.





Figs. 1—3. All photomicrographs  $\times 2000$ . Fig. 1: Male mitosis ( $2n = 36$ ). Figs. 2 and 3: second metaphase with seventeen (Fig. 2) and nineteen (Fig. 3) chromosomes



Fig. 4. Spermatogonial metaphase  $\times 2500$

## B. Material and technique

Male imagines were obtained from Bedwas Colliery, Glamorgan. The testes were dissected out under insect saline (BAKER 1950) and fixed in a 1:3 acetic-alcohol mixture. Squash preparations were made in acetic-lacmoid, acetic-orcein and acetocarmine, and also with the Feulgen and light-green schedule of DARLINGTON and LA COUR (1942).

## C. Observations

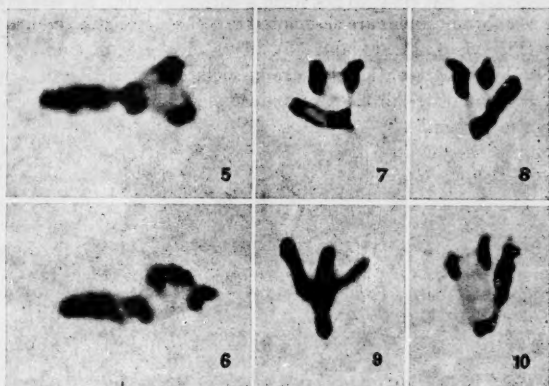
### 1. The karyotype

There are thirty-six chromosomes in the pre-meiotic nuclei of the male (Fig. 1). The majority of these are acrocentric (Fig. 4) but morphological differences are not sufficient to permit a complete analysis of the complement. Sister nuclei after the first meiotic division contain seventeen (Fig. 2) and nineteen (Fig. 3) chromosomes respectively.

This is in agreement with the chromosome formula given by GUÉNIN (1949) for this species:

$$\text{♂, } 2n = 32 + X_1 X_2 X_3 Y = 36$$

$$\text{♀, } 2n = 32 + X_1 X_1 X_2 X_2 X_3 X_3 = 38$$



Figs. 5—10. All photomicrographs  $\times 4000$ . Sex association at late prophase (Figs. 5—6) and at metaphase (Figs. 7—10). Note orientation of multiple (Y lowermost) and attenuation of terminal association between  $X_1$  and Y in Fig. 10

## II. Meiosis

1. *The autosomes.* The autosomes are undistinguished in their behaviour but two observations are significant:

a) All the autosomes are euchromatic but the regions adjacent to the centromeres condense precociously (Fig. 12). Although overcharged these centric blocks show no tendency to associate with one another (cf. SMITH 1952b) but one autosomal bivalent may be associated with the sex chromosomes at prophase (Fig. 14); this association does not persist however.

b) The chiasmata are localised near the chromosome ends and terminalise rapidly. Indeed the majority are terminal by diplotene.

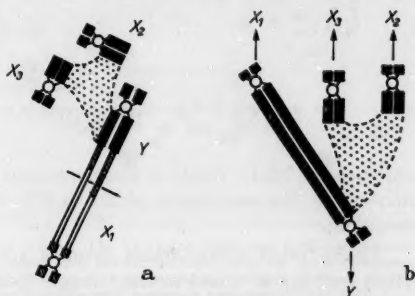


Fig. 11a and b. a Diagrammatic representation of the sex association at the end of pachytene, and b its orientation at metaphase. In a only the heterochromatin is shown solid; in both the nucleolus in stippled. Note pro-centric condensation of  $X_1$  in a

In most cases there is only one chiasma per bivalent resulting in a predominance of rods at metaphase.

2. *The sex chromosomes.* The positive heterochromasy of certain of the sex chromosomes distinguishes them from the autosomes at early prophase. But they do not form a chromocentre. By late prophase the four sex chromosomes are associated in a characteristic and invariable manner (Figs. 5, 6, 11, 14 and 15). Two of them (X2 and X3) are positively heterochromatic and are associated at a distance with a similar segment of a third sex chromosome, the Y, in a triangle. The euchromatic segment of the latter is associated terminally with the long arm of the fourth sex

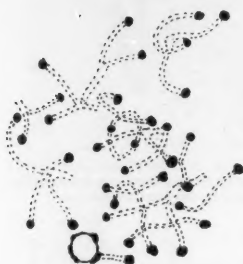


Fig. 12

Fig. 12. Pachytene, note centric precocity and the spherical nature of the heterochromatic nuclear association,  $\times 2500$  (Semi-diagrammatic)



Fig. 13

Fig. 13. Late diplotene, note pro-centric charging of the euchromatic autosomes and X1,  $\times 2500$

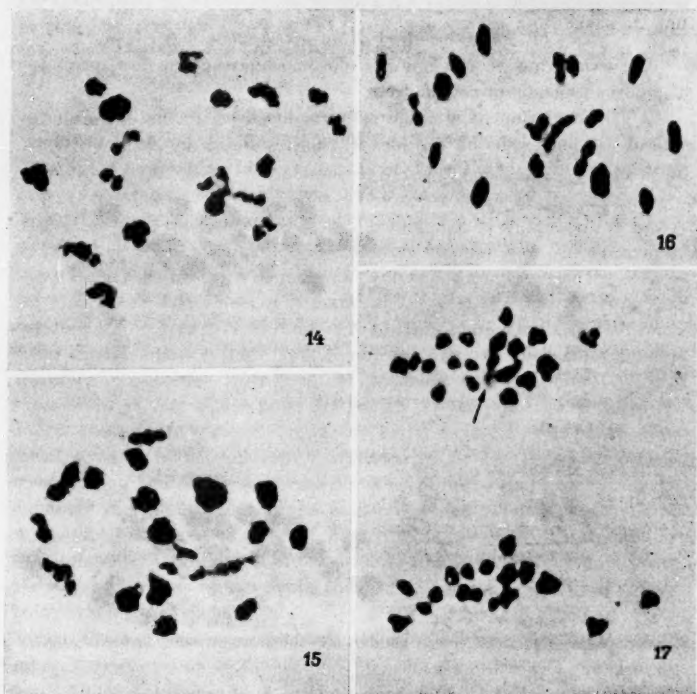
chromosome (X1) which is also euchromatic. There is no reason to doubt that the association of X1 and Y is a consequence of chiasma formation.

Unlike other acetic stains carmine reveals the nucleolus (LEWIS 1957) and this is found in the triangle formed by X2, X3 and the Y which otherwise have no material connection at late prophase.

The nucleolus is initially spherical but becomes triangular as a result of repulsion between the centromeres of the sex chromosomes. This repulsion is unequal so that the X2 and X3 chromosomes are nearer each other than they are to the Y (Fig. 15). The centromere of X1 also is repelled by that of the Y, usually in an opposite direction to the other two X chromosomes.

At metaphase orientation is invariably convergent: the three X chromosomes orientate towards one pole and the Y orientates towards

the other (Figs. 7, 8, 9, 11 and 16). At this stage the Y chromosome may be attenuated between the centromere and its terminal association with X1 (Fig. 10). No case of misorientation has been observed in over two hundred metaphases. The nucleolus persists and moves to the same



Figs. 14—17. All photomicrographs  $\times 2000$ . Fig. 14. Early diakinesis with a non-homologous association between one autosome and the sex multiple. Fig. 15. Late diakinesis, note the isosceles arrangement of X2, X3 and the heterochromatic portion of the Y. Fig. 16. First metaphase. Fig. 17. First anaphase with persistent nucleolus (cf. Fig. 19)

pole as the X chromosomes (Figs. 17 and 19). Here it becomes detached (Fig. 18) and disappears. It does not appear at the second division during which the sex chromosomes divide equationally.

#### D. Discussion

##### 1. The nature of the sex chromosomes

Both X2 and X3 are small and positively heterochromatic during the first prophase: the position of their centromeres cannot be

determined with certainty. The larger X1 is acrocentric and euchromatic but shows precocious condensation near the centromere (Fig. 6) as do the autosomes. The Y chromosome is smaller but is also acrocentric; excepting a short terminal euchromatic pairing segment its long arm is heterochromatic.

## II. The association of the sex chromosomes

The association of the four sex chromosomes at the first prophase of meiosis depends on two factors:

1. The formation of a single chiasma localised at the euchromatic ends of the long arms of X1 and Y: this results in an X1 Y bivalent.



Fig. 18

Fig. 18. Anaphase I; autosomes in outline, sex chromosomes solid, nucleolus stippled.  $\times 2500$

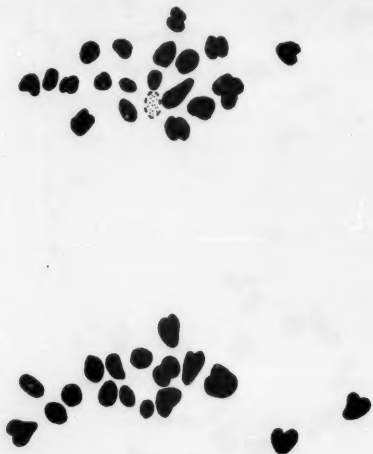


Fig. 19

Fig. 19. Anaphase I; nucleolus stippled (cf. Fig. 17).  $\times 2500$

2. Initially the X2, X3 and Y chromosomes may associate by a non-homologous attraction, a consequence of their heterochromasy. That such an attraction exists is indicated by the fact that an autosome may also associate with the sex complex during early prophase, by virtue of the precocity of its centric region (Fig. 14). But this cannot account for the association of these three sex members at later stages. Autosomes are never associated with the sex complex at metaphase: this indicates a lapse of non-homologous attraction similar to that responsible for the break up of chromocentres. The X2, X3 and Y chromosomes are then held together, in spite of their repulsion, by their association with a common nucleolus.

GUÉNIN in his brief report of 1949 suggested that the pairing of the sex chromosomes in *Blaps* indicated the presence of inversions. We have found nothing to support this. Finally, from the figures of GUÉNIN (1952) and SMITH and EDGAR (1954), we would infer that a similar basis for association probably exists in the  $nXY$  cicindelids, namely that the pairing between the Y and one of the X's is specific and chiasmate but that the additional X's are associated non-specifically with one or other of the pairing members.

### III. Orientation of the sex association

At first metaphase the centromeres of the  $X1Y$  bivalent co-orientate like those of any other bivalent. The centromere of the Y also co-orientates with the centromeres of  $X2$  and  $X3$ . The reason for this is apparent as early as diakinesis: repulsion between the centromeres of these three chromosomes is unequal. The repulsion between the centromere of the Y and those of  $X2$  and  $X3$  is greater than the repulsion between the centromeres of  $X2$  and  $X3$  themselves. That the Y chromosome should balance these two X chromosomes at first metaphase is therefore expected. Trivalents, in triploids and trisomics, arrange themselves at metaphase most frequently so that the centromeres between which there is greatest repulsion lie on opposite sides of the equatorial plate (DARLINGTON 1939b, ÖSTERGREEN 1951). There the centromeres, being homologous, cannot be unequal and the inter-centromeric distances are determined by the positions of the chiasmata. A similar suggestion has been put forward by STURTEVANT (1936) to account for the preferential segregation of the triploid fourth chromosome in *Drosophila melanogaster*. But in *Blaps* the inter-centromeric distances cannot be determined by chiasmata.

In *Blaps* the isosceles arrangement of the heterochromatic components indicates, and is determined by, the asymmetrical strengths of the centromeres because it exists before spindle forces are involved. The ability of the Y centromere to balance the centromeres of all three X chromosomes also arises from this disproportionality, a condition which may also apply to the *Heteroptera* (DARLINGTON 1939a).

Although the  $X1$  chromosome on the one hand and the  $X2$  and  $X3$  chromosomes on the other are on opposite sides of the Y at diakinesis they are invariably on the same side at metaphase. A convergent orientation, with the Y centrally placed, is presumably prevented by the rigidity of the multiple. This may be due, in part, to the greater degree of coiling at metaphase but it also suggests that the Y chromosome is associated with the nucleolus by its long arm, the arm which also has the pairing segment, thus making for less pliability.

The attenuation of the Y chromosome at metaphase (Fig. 10) suggests that, although opposing centromeres are equidistant from the poles, the body of the multiple, including the nucleolus, lies to one side of the equatorial plate (DARLINGTON 1936, UPCOTT 1939). This may explain why the nucleolus invariably passes to the same pole as the X chromosomes.

Thus, the Y chromosome plays a fundamental role in the disjunction of the X chromosomes. Further, although there exist species with an XX/XO sex chromosome mechanism none of the known beetles have a nXO system. It would appear, therefore, that the Y chromosome is retained in the multiple systems of *Blaps* and *Cicindela* because of its mechanical function and not its genetical activity, as has been suggested for the Heteroptera (DARLINGTON 1939a).

#### IV. The origin and evolution of the *Blaps* system

The preponderance of tenebrionid species with the karyotype  $2n = 18 + Xy_p:XX$  led SMITH (1952b) to conclude that this represents the basic karyotype of the group. Here the sex bivalent in the male consists of a relatively large metacentric X and a very much smaller metacentric y forming an asymmetrical ring bivalent whose shape has been likened to a parachute ( $Xy_p$ ).

If this is the case, then a survey of the established karyotypes in the genus *Blaps* (GUÉNIN 1949, 1952) suggests the operation of two principal factors in the evolution of this group:

1. Polyploidy.
2. Sex-autosome translocation.

Since the genic unbalance consequent upon a loss of chromosomes is less serious in a polyploid than in a diploid it is probable that polyploidy preceded translocation. *Blaps lusitanica*<sup>1</sup> ( $2n = 16 + X1 X2 Y$ :  $X1 X1 X2 X2$ ) constitutes an exception since here only translocation has occurred. Presumably this involved the original X and one of a pair of autosomes, the homologue of which then took over the mechanical function of the minute  $y_p$  which was lost (Fig. 20). This would result in the replacement of the basic  $Xy_p$  system by a neo  $X1 X2 Y$  system and simultaneously reduce the autosome number by two.

As far as the remaining species are concerned the numerical relationship between *lethifera* ( $2n = 34 + 2XY$ ), *mortisaga* and *mucronata* ( $2n = 32 + 3XY$ ) and *gigas* ( $2n = 30 + 4XY$ ) indicates that with each gain of an extra X there is a reduction of two in the autosome number. Thus starting with a karyotype  $2n = 36 + Xy_p$  successive sex

<sup>1</sup> This is the *lusitanica* of GUÉNIN (1949) and not that of NONIDÉZ (1914, 1920), cf. WHITE 1954.



autosome translocations, involving the pairing X, and repeated reduction and loss of the Y would give the karyotype sequence,

$$2n = 36 + XY \rightarrow 34 + 2XY \rightarrow 32 + 3XY \rightarrow 30 + 4XY.$$

On this basis the non-pairing X's would clearly be non-homologous. This constitutes an exception to the generalisation (WHITE 1940, 1954) that the inclusion of autosomal material into a sex system does not lead to anything more complicated than an X1X2 Y mechanism.

In considering the way in which polyploidy and translocation may be related in the evolution of *Blaps* three relevant points arise:

1. There is evidence (DARLINGTON 1953) to suggest that polyploidy in unisexual animals is more likely to succeed when accompanied by hybridisation. If hybridity has played a part in the evolution of *Blaps* it could have preceded or followed polyploidy: no preference can be expressed between these alternatives on the basis of observation. There are however two points in favour of the former:

a) Suppression of the first meiotic division, which would result in polyploidy, is more likely to occur in a hybrid with failure of pairing than in a diploid with complete pairing, and

b) Autopolyploids are often highly sterile as a result of multivalent formation and non-disjunction. But in *Blaps mucronata* the chromosomes are predominantly acrocentric with only one chiasma per arm. This would limit multivalent formation and consequently improve the fertility of an autopolyploid.

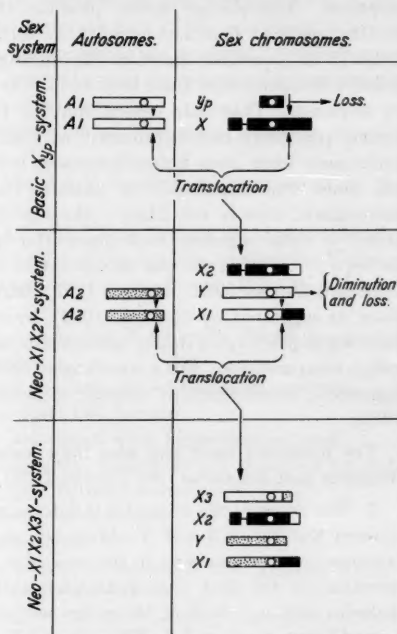


Fig. 20. Diagram to illustrate the suggested mode of evolution of the sex multiple system in the genus *Blaps*. For simplicity the same breakage locus is indicated in both X and X1. The X is shown with a nucleolar organiser

Lastly, polyploidy, when it arose, may not initially have affected the whole individual but could have occurred only in some of the germ cells. Polyploid cysts, for instance, are not uncommon in the male gonadial follicles of insects (SUOMALAINEN 1946, WHITE 1954).

2. The translocations could either have been reciprocal or non-reciprocal. Interchange would produce an X2 chromosome with a terminal segment homologous with the terminal part of the short arm of the Y. It is possible therefore that multiple formation by pairing and chiasma formation may have been an intermediate stage in the evolutionary sequence. That this ceased may be because the non-pairing X's became positively heterochromatic at first prophase. Autosomal segments may have been heterochromatic before they were translocated but, since the autosomes in existing tenebrionids are invariably euchromatic, this is not likely. More probably the "heterochromatisation" of these segments took place after translocation. Such a change has been recorded in the sex chromosomes of other species (KING 1950, KING and BEAMS 1938, REVELL 1947, SMITH 1952a). This could take place, as suggested by MULLER (1932), by the mutation of the genes in these segments to genetically non-specific alleles and the acquisition of dosage compensation. But a coordinated change in a number of segments suggests a "block reaction" similar to those discussed by DARLINGTON (1956).

The nucleolus itself can also limit crossing over as was found in *Fritillaria* and *Eremurus* (see UPCOTT 1936).

3. The shape of the nucleolus is determined by the forces of repulsion between the X2, X3 and Y chromosomes. This shows that all these chromosomes are attached to the nucleolus. DARLINGTON (1947) draws attention to the fact that heterochromatin will not "stick" to the nucleolus although both of these are self-sticky. If this holds in *Blaps* it would appear that X2, X3 and the Y must all contribute to the organisation of the nucleolus. This they may do by virtue of their "heterochromatisation" although there is no necessary connection between nucleolar organisers and heterochromatin (LA COUR 1951). In XO and XY tenebrionids the nucleolus is organised by a terminal heterochromatic X segment (SMITH 1952b): the X2 of the neo X1 X2 Y system might, therefore, have been partly heterochromatic and responsible for organising the nucleolus. How the Y came to be involved in nucleolar organisation is far from clear but that it can do so is indicated by the work of SMITH and EDGAR (1955).

That factors other than these must also operate in the evolution of the sex system in this genus follows from the karyotype  $2n = 18 + 12X6Y$  which GUÉNIN has described for the male of *Blaps polychestra*.

### Summary

I. *Blaps mucronata* has a diploid number of thirty six chromosomes in the male; four of these are sex chromosomes. Second metaphase nuclei contain either seventeen or nineteen chromosomes indicating a segregation of three X chromosomes from a single Y at the first division.

II. A distal euchromatic segment of the acrocentric Y pairs by chiasma formation with the terminal part of the euchromatic acrocentric X1. The other two X chromosomes are positively heterochromatic at first prophase and they associate with the proximal heterochromatic segment of the Y by means of a nucleolus.

III. The metaphase orientation of the sex-multiple is invariably convergent:

1. The centromeres of the X1 Y bivalent co-orientate as do those of normal bivalents.

2. The centromeres of X2 and X3 on the one hand and that of the Y on the other lie on opposite sides of the equator because the Y chromosome repels the two X chromosomes more strongly than they repel one another.

3. Convergent orientation, with the Y centrally placed, is prevented by the rigidity of the multiple.

IV. The evolution of the multiple sex chromosome systems in the genus *Blaps* has involved at least two factors:

1. Polyploidy, possibly associated with hybridisation, and

2. successive allosome/autosome translocations followed by reduction and loss of the Y and the "heterochromatinisation" of:

a) the non-pairing X-chromosomes, and

b) the differential segment of the Y.

**Acknowledgments.** We are grateful to the South West Division N.C.B. for allowing us to collect material from Bedwas Colliery.

### Literature cited

- BAKER, J. R.: Cytological technique. London: Methuen 1950. — CALLAN, H. G., and P. A. JACOBS: The meiotic process in *Mantis religiosa* L. males. J. Genet. **55**, 200—217 (1957). — COOPER, K. W.: The mechanism of non-random segregation of sex chromosomes in male *Drosophila miranda*. Genetics **31**, 181—194 (1946). — DARLINGTON, C. D.: The external mechanics of the chromosomes. I.—IV. Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B **121**, 264—319 (1936). — The genetical and mechanical properties of the sex chromosomes. V. *Cimex* and the *Heteroptera*. J. Genet. **39**, 101—137 (1939a). — The evolution of genetic systems. Cambridge: University Press 1939b. — Nucleic acid and the chromosomes. Symposia Soc. Exper. Biol. **1**, 252—269 (1947). — Polyploidy in animals. Nature (Lond.) **171**, 191 (1953). — Conference on chromosomes. Netherland 1956. — DARLINGTON, C. D., and L. F. LA COUR: The handling of chromosomes. London: Allen & Unwin 1942. — GUÉNIN, H. A.: L'évolution de la formule chromosomique dans le genre *Blaps* (Coleopt. Ténébr.) Rev. Suisse Zool. **56**, 336 (1949). — Hétérochromosomes de Cicindèles. Rev. suisse Zool. **59**, 277—282 (1952). — Les chromo-

somes sexuels multiples du *Blaps polychestra* FORSK. (Col. Ténébr.) Rev. suisse Zool. **60**, 462—466 (1953). — KING, R. L.: Neo-Y chromosome in *Hypochlora alba* and *Mermiria intertexta* (Orthoptera: Acrididae). J. of Morph. **87**, 227—257 (1950). — KING, R. L., and H. W. BEAMS: The multiple chromosomes of *Paratytopidia brunneri* SCUDDER (Orthoptera: Acrididae). J. of Morph. **63**, 289 bis 300 (1938). — LA COUR, L. F.: Heterochromatin and the organisation of nucleoli in plants. Heredity (Lond.) **5**, 37—50 (1951). — LEWIS, K. R.: Squash techniques in the cytological investigation of mosses. Trans. Brit. Bryological Soc. **3**, 279—284 (1957). — MULLER, H. J.: Some genetic aspects of sex. Amer. Naturalist **66**, 118—138 (1932). — ÖSTERGREN, G.: The mechanism of co-orientation in bivalents and multivalents. The theory of orientation by pulling. Hereditas (Lund) **37**, 85—156 (1951). — PIZA, S. DE T.: Uma nova modalidade de sexodeterminação no grilo sud-americana *Eneoptera surinamensis*. An. Esc. Agricult. Queiroz **3**, 69—88 (1946). — PAYNE, F.: The chromosomes of *Gryllotalpa borealis* BURM. Arch. Zellforsch. **9**, 141—148 (1912). — A study of the germ cells of *Gryllotalpa borealis* and *Gryllotalpa vulgaris*. J. of Morph. **28**, 287—327 (1916). — REVELL, S. H.: Controlled X-segregation at meiosis in *Tegenaria*. Heredity (Lond.) **1**, 337—347 (1947). — SHARMAN, G. B., and H. N. BARBER: Multiple sex chromosomes in the marsupial *Potorus*. Heredity (Lond.) **6**, 345—355 (1952). — SMITH, S. G.: The evolution of heterochromatin in the genus *Tripsolium* (Tenebrionidae, Coleoptera). Chromosoma **4**, 585—610 (1952a). — The cytology of some tenebrionid beetles (Coleoptera). J. of Morph. **91**, 325—363 (1952b). — Chromosome numbers of Coleoptera. Heredity (Lond.) **7**, 31—48 (1953). — SMITH, S. G., and R. S. EDGAR: The sex determining mechanism in some North American *Cicindelidae* (Coleoptera). Rev. suisse Zool. **32**, 657—667 (1954). — STURTEVANT, A. H.: Preferential segregation in triplo-IV females of *Drosophila melanogaster*. Genetics **21**, 444—446 (1936). — SUOMALAINEN, E.: Die Chromosomenverhältnisse in der Spermatogenese einiger Blattarien. Ann. Acad. Sci. fenn., Ser. A **4**, Nr 10, 1—60 (1946). — URCOTT, M.: The origin and behaviour of chiasmata XII. *Eremurus spectabilis*. Cytologia **7**, 118—130 (1936). — The genetical structure of *Tulipa*. III. Meiosis in polyploids. J. Genet. **37**, 303—339 (1939). — WHITE, M. J. D.: The origin and evolution of multiple sex chromosome mechanisms. J. Genet. **40**, 303—336 (1940). Animal cytology and evolution. Cambridge: University Press 1954.

K. R. LEWIS, Dept. of Botany, The University of Oxford,  
B. JOHN, Dept. of Zoology, The University College of South Wales  
and Monmouthshire, Cardiff, Wales (England)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Wien

# ÜBER DAS CHROMOSOMEN- UND KERNWACHSTUM IN DER WURZEL VON HAEMANTHUS

Von

E. TSCHERMAK-WOESS und R. DOLEŽAL-JANISCH

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 22. Juli 1957)

Es ist eine altbekannte Tatsache, daß die Chromosomengröße bei vielen Arten intraindividuellen Schwankungen unterliegt; und zwar bestehen bei Pflanzen Unterschiede zwischen Meristem und Dauergewebe sowie zwischen verschiedenen Dauergeweben und Zellsorten. Ein geläufiges Beispiel ist auch die Verminderung der Chromosomengröße während der Furchungsteilungen tierischer Eier (ältere Literatur bei GEITLER 1938, S. 7 ff.). Weiter besteht ein Zusammenhang zwischen Chromosomengröße und Kerngröße, indem die Zunahme des Chromosomenvolumens einer von mehreren Faktoren ist, die mit der Zunahme des Kernvolumens einhergehen können (vgl. GEITLER zuletzt 1953, S. 60). Diese Dinge wurden zumeist nur gelegentlich anderweitiger Untersuchungen festgestellt (z. B. LAUBER; HOLZER; TSCHERMAK-WOESS und DOLEŽAL; TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA 1953, 1954; CZEIKA). Nur GEITLER (1939/40) versuchte die gewebespezifischen Unterschiede im Kern- und Chromosomenvolumen bei *Rhoeo discolor* quantitativ zu erfassen. Sie verdienen aber im Hinblick auf neuere Kenntnisse und Vorstellungen über den inneren Aufbau der Chromosomen, ihre chemische Zusammensetzung und die mehr minder konstanten quantitativen Beziehungen zwischen Chromosomen und DNS bzw. Histonen neuerliches weiteres Interesse. In den letzten Jahren setzt sich nämlich auf Grund von genetischen Resultaten sowie von elektronenmikroskopischen Bildern (die allerdings zum Großteil noch nicht überzeugen) immer mehr die Ansicht durch, daß die Chromosomen sich aus einer gewissen Zahl sublichtmikroskopischer Fibrillen zusammensetzen (vgl. z. B. RIS). Auch an eine Konstanz der DNS je Fibrille wird gedacht, und Unterschiede zwischen Individuen und Arten im DNS-Gehalt bei gleicher Zahl und Morphologie, aber gesteigerter Größe der Chromosomen erklärt man hypothetisch mit Unterschieden in der Anzahl der Fibrillen je Chromosom (HUGHES-SCHRADER und SCHRADER; ALFERT und BALAMUTH). Schon GEITLER (1939/40) erwog die Möglichkeit, die Volumenzunahme der Chromosomen von *Rhoeo* bis auf das 4fache auf eine Vermehrung der Chromonemen — jetzt würde man sagen: der Fibrillen — zurück-

zuföhren. Jedenfalls kann man sich vorstellen, daß die Zahl der Fibrillen je Chromosom intraindividuellen, gesetzmäßigen Schwankungen unterliegt und diese im Chromosomen- und Kernvolumen zum Ausdruck kommen. Ein erster Schritt wäre also, die Volumenschwankungen möglichst genau zu erfassen, der nächste bestünde dann in der mikrophotometrischen Bestimmung des DNS-Gehaltes der Ruhekerne mit kleinen und großen Chromosomen. — Andere Faktoren, die von Einfluß auf das Chromosomenvolumen sein könnten, sind die Art der Spiralisierung und der Hydratationsgrad, und schließlich könnte bloß genetisch bedeutungsloses „Ballast“-Material zu seiner Vergrößerung beitragen.

Wir versuchten in der vorliegenden Arbeit zur Klärung der ersten Voraussetzungen beizutragen, indem wir die Volumenverhältnisse der Chromosomen (und Kerne) bei *Haemanthus katharinae* verfolgten. Dieses Objekt wählten wir, weil es relativ große Chromosomen und rein diploide Wurzeln besitzt (vgl. HOLZER), was besonders im Hinblick auf etwaige zukünftige DNS-Messungen günstiger ist, als wenn sich — wie etwa bei *Rhoeo* — die Unterschiede in der Chromosomengröße mit Unterschieden im Grad der Endopolyploidie kombinieren.

#### Material und Methode

Gut wachsende Wurzeln von *Haemanthus* erhielten wir von Keimlingen, die auf Gaze über Brunnenwasser herangezogen wurden (Keimung frisch geernteter, nicht von der fleischigen Fruchtwand befreiter Samen im Winter innerhalb einer Woche, Untersuchung der Sekundärwurzeln) und von Stecklingen ungefähr 3 bis 4 Wochen nach dem Einstellen in Brunnenwasser. Es wurden nur 6–7 cm lange und 2–3 mm dicke unverzweigte Wurzeln verwendet, da es sich in anderen Fällen gezeigt hatte, daß zwischen Wurzeln verschiedenen Durchmessers oft bedeutende Unterschiede im Kernvolumen bestehen (TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA 1954, DOLEŽAL und TSCHERMAK-WOESS). Zur Auslösung der Mitosen im Dauer- gewebe wurde mit Heteroauxin (20 mg/l) 24–48 Std durchgehend behandelt. Die Wurzeln wurden im Leben der Länge nach geschnitten, in Alkohol-Eisessig kalt fixiert und in Karminessigsäure unter Erwärmung gefärbt. Das Meristem von 3 mm Länge wurde abgetrennt und nur mäßig gequetscht, so daß der Aufbau zu erkennen blieb. Die medianen Schnitte durch den ausdifferenzierten Teil der Wurzel wurden zur Untersuchung in 2 cm lange Stücke zerlegt, um die Entfernung von Teilungsfiguren bzw. Ruhekernen vom Meristem berücksichtigen zu können.

Alle Messungen wurden an Zellen der 3.—6. Rinden- bzw. Periblemschicht von der Endodermis aus durchgeführt, da nach unseren Erfahrungen an anderen Arten die peripheren und mittleren Schichten sich im Kernvolumen verschieden verhalten. Das Volumen der Ruhekerne wurde nach der Formel für das Sackartige Rotationsellipsoid unter Weglassung des Faktors  $4\pi/3$  berechnet (Bestimmung von 2 Durchmesser mit dem Okularmikrometer auf  $1/10\mu$  genau, des dritten mittels der Skala an der Mikrometerschraube unter 3maliger Überprüfung auf  $1\mu$  genau. Da man das Volumen aller Chromosomen des diploiden Satzes nicht ermitteln kann, weil sowohl in Metaphasen wie in Anaphasen stets mehrere Chromosomen sich optisch verkürzt zeigen, wurde ein SAT-Chromosom — sozusagen als Repräsentant für den ganzen Chromosomensatz — herangezogen und in mittleren Anaphasen aus-

gemessen (*Haemanthus katharinae* hat 1 SAT-Chromosom im haploiden Satz, es handelt sich um eines der längsten Chromosomen, und zwar um ein leicht ungleichschenkeliges; die SAT-Zone liegt im kürzeren Schenkel submedian; bei Anwendung der Karminessigsäure-Technik erscheint sie meist nur als Einschnürung — vgl. Abb. 1a und b). Der Querschnitt der Anaphasechromosomen ist, wie man an optischen Schnitten sieht, nicht ganz kreisförmig, sondern leicht elliptisch; der Unterschied zwischen  $d_1$  und  $d_2$  beträgt  $0,3-0,6\mu$  und läßt sich in der Seitenansicht bei Messung mittels der Skala an der Mikrometerschraube nicht genau erfassen. Das Volumen der Chromosomen wurde daher aus dem quer zur Blickrichtung verlaufenden Durchmesser und der Länge (beide\* auf  $\frac{1}{2}\mu$  genau gemessen,  $r$  daher

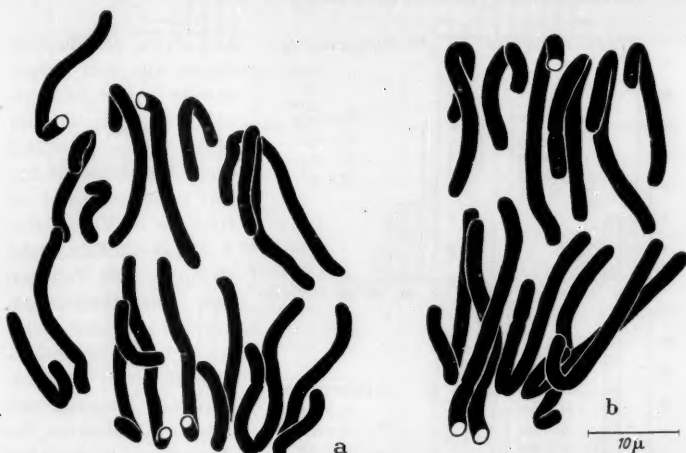


Abb. 1a u. b. *Haemanthus katharinae*; Anaphasen aus einer Stecklingswurzel, a aus dem Meristem, b aus dem Dauergewebe (beide unvollständig). — Alk.-Eisessig, Essigkarmün

auf  $\frac{1}{4}\mu$  genau) nach der Formel für den Zylinder aus  $r^2\pi h$  unter Weglassung von  $\pi$  berechnet in der Annahme, daß bei ungefähr gleich viel Chromosomen der längere und der kürzere Durchmesser (und ebenso die dazwischenliegenden) ausgemessen wurde und die an sich schon geringen Fehler sich somit ausgleichen.

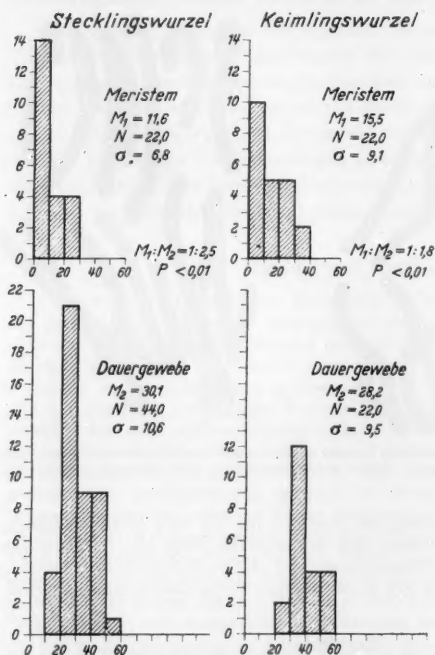
### Resultate

Zunächst untersuchten wir die Chromosomen aus Stecklingswurzeln. Zwischen Meristem und Dauergewebe bestehen nicht sehr auffallende, aber bei einem genauen Vergleich doch deutliche und durchgehende Unterschiede in der Chromosomengröße, und zwar sind die Chromosomen aus dem Dauergewebe etwas dicker, jedoch nicht wesentlich länger als die meristematischen. Diese visuelle Beobachtung bestätigt sich bei der Anstellung von Messungen (vgl. die Diagramme der Abb. 2); das Volumen der meristematischen Chromosomen beträgt nämlich im Mittel



Tabelle 1. *Haemanthus katharinae*. Volumina der Chromosomen aus der Rinde einer Stecklingswurzel

	Abstand vom Meristem				
	0—1 cm	1—2 cm	2—3 cm	3—4 cm	4—5 cm
Mittelwert	keine Teilungen	29,7 $\mu^3$	27,4 $\mu^3$	33,7 $\mu^3$	31,6 $\mu^3$
N		14	11	8	10
$\sigma$		8,9	13,1	8,5	9,9

Unterschiede durchwegs nicht signifikant ( $P \gg 0,5$ ).Abb. 2. *Haemanthus katharinae*: Diagramme der Chromosomen volumina (links aus dem Meristem und Dauergewebe der gleichen Stecklingswurzel, rechts aus dem Meristem und Dauergewebe der gleichen Keimlingswurzel. — Volumina der Chromosomen auf der Abszisse, Anzahl auf der Ordinate eingetragen)

<sup>1</sup> Um eventuelle, von der Beschaffenheit der Wurzel abhängige Unterschiede auszuschalten, wurden alle Chromosomenmessungen an einer Wurzel ausgeführt. Die stichprobenartige Überprüfung an anderen Wurzeln ergibt die gleichen Verhältnisse.

11,6  $\mu^3$ , das der Chromosomen aus dem Dauergewebe 30,1  $\mu^3$  (im Meristem  $r = 0,6-0,9$ , im Mittel 0,66  $\mu$ ,  $h = 24,0$  bis 28,8, im Mittel 26,2  $\mu$ ; im Dauergewebe  $r = 0,6-1,5$ , im Mittel 1,0  $\mu$ ,  $h = 24,0-32,4$ , im Mittel 27,6  $\mu$ )<sup>1</sup>. Das Volumen der meristematischen verhält sich zum Volumen der Dauergewebe-Chromosomen wie 1:2,5. Zwischen jüngeren und älteren Abschnitten des Dauergewebes bestehen keine wesentlichen Unterschiede im Chromosomenvolumen (Tabelle 1); allerdings traten im jüngsten Teil von 0—1 cm hinter dem Meristem nie Mitosen auf.

Da wir auf Grund der Angaben von HOLZER kräftigere Unterschiede zwischen Meristem und Dauergewebe erwarteten

und HOLZER ausschließlich Keimlingswurzeln verwendet hatte, untersuchten wir zum Vergleich auch Sekundärwurzeln von Keimlingen; doch zeigten sich bei diesen praktisch die gleichen Verhältnisse wie bei den

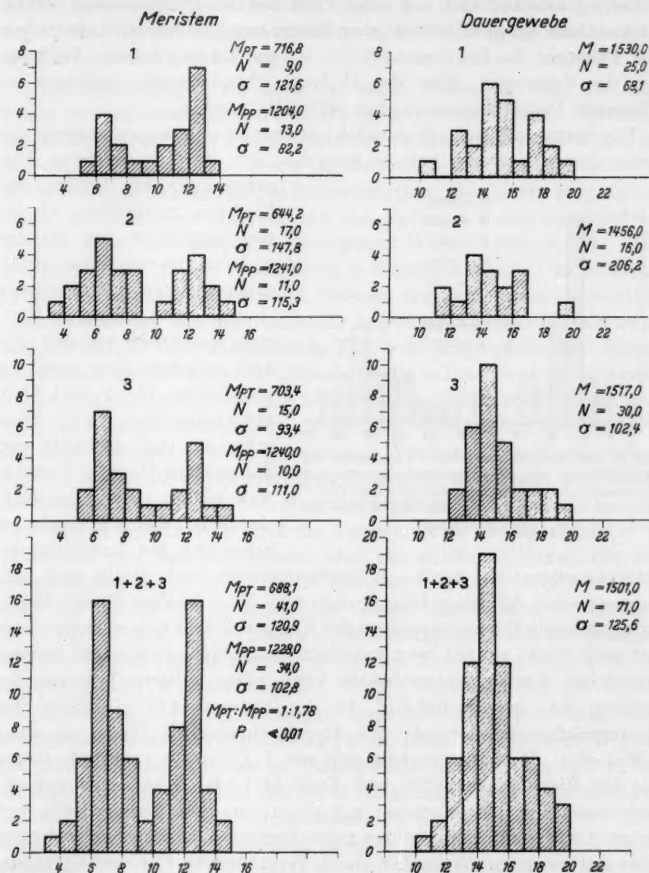


Abb. 3. *Haemanthus katharinae*; Diagramme der Kernvolumina aus 3 unbehandelten Stecklingswurzeln (linke Reihe: Meristem, rechte Reihe: Dauergewebe. — Volumina auf der Abszisse, Anzahl der Kerne auf der Ordinate)

Stecklingswurzeln, nämlich im Meristem ein mittleres Volumen von  $15,5 \mu^3$ , im Dauergewebe von  $28,2 \mu^3$  und eine Relation von 1:1,8 (Abb. 2). Die Unterschiede zwischen den Keimlings- und Stecklingswurzeln muß

man angesichts der Schwierigkeiten, die sich der genauen Ermittlung des Chromosomenvolumens entgegenstellen, wohl als zufallsbedingt ansehen (zu den auf S. 83 erwähnten Schwierigkeiten kommt noch, daß die Vergrößerung hauptsächlich auf einer Zunahme des Durchmessers beruht, bei Annahme der gleichen mittleren Länge von  $27\mu$  bedeutet aber schon eine Zunahme des Durchmessers von  $0,7$  auf  $1\mu$  bereits eine Verdopplung des Volumens). Eine das  $1\frac{1}{2}$ -fache übersteigende, vielleicht bei 2 liegende Vergrößerung ist aber jedenfalls gegeben.

Um herauszufinden, ob parallel mit dem Chromosomenvolumen das Kernvolumen ansteigt, galt es zunächst, um einen bestimmten Aus-

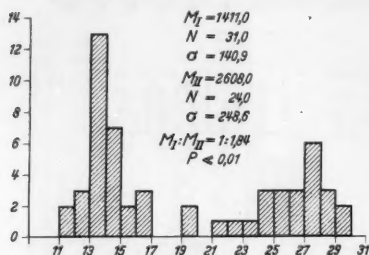


Abb. 4. *Haemanthus katharinae*; Diagramm der Kernvolumina aus dem Dauergewebe einer mit Heteroauxin behandelten Stecklingswurzel (Volumina auf der Abszisse, Anzahl der Kerne auf der Ordinate)

gangspunkt zu haben, die Vorfrage zu prüfen, ob bei *Haemanthus* so wie bei den anderen von uns bisher untersuchten Arten das intermitotische Kernwachstum im Meristem sprunghaft vor sich geht und zwischen dem posttelophasischen (2 C) und dem präprophasischen (4 C) Wert schwankt (vgl. DOLEŽAL und TSCHERMAK-WOESS; TSCHERMAK-WOESS und DOLEŽAL-JANISCH). Bei 3 Wurzeln er-

geben sich bei Aufteilung der Interphasekerne aus der 3.—6. Periblemschicht nach Größe und Zahl ausgesprochen 2gipfelige Diagramme (Abb. 3); d. h. also: die der Mitose vorausgehende Volumenzunahme der Kerne vollzieht sich auch bei dieser Art sehr rasch, so daß man zwischen posttelophasischen und präprophasischen Kernen unterscheiden kann. Das mittlere Volumen der ersteren (2 C) beträgt  $688,1\mu^3$ , das der letzteren (4 C) ist  $1228\mu^3$  (bei Zusammenfassung der sehr gut übereinstimmenden Werte aus allen 3 Wurzeln).  $M_{PT}:M_{PP}$  verhält sich wie 1:1,78, also praktisch ebenso wie bei *Rhoeo* (mit 1:1,79) und *Vicia* (1:1,82). Wenn man nun die Ruhekerne aus dem Meristem mit denen aus dem Dauergewebe vergleichen will, muß man von den posttelophasischen ausgehen und nicht etwa von den präprophasischen, deren Vergrößerung, Chromatinzunahme und DNS-Verdopplung ja nur eine Vorbereitung auf die Mitose bedeutet. Stellt man von den gleichen Wurzeln, von denen das Meristem untersucht wurde, die Kernvolumina der 3.—6. Rindenschicht aus dem Dauergewebe zusammen, so erhält man erwartungsgemäß im wesentlichen eingipfelige Diagramme (Nebengipfel nur zufallsbedingt) mit Normalverteilung (Abb. 3, rechts). Ganz eindeutig zeigt sich die Eingipfelig-

keit und die Normalverteilung bei Zusammenfassung in einem einzigen Diagramm (Abb. 3, unten rechts). Das mittlere Volumen der Kerne aus dem Dauergewebe liegt bei  $1501 \mu^3$  und ist 2,2mal so hoch wie das Volumen der posttelophasischen Ruhekerne aus dem Meristem. Chromosomen- und Kernwachstum verlaufen also beim Übergang vom Meristem ins Dauergewebe gleichsinnig.

Schließlich gingen wir noch auf einen Punkt ein, den wir schon früher erörtert, aber nicht durch Messungen belegt hatten. Auf Grund der Erfahrung an einer Reihe von Arten hatten wir den Eindruck, daß es auch im Dauergewebe so wie im Meristem vor dem Eintritt in die Mitose zu einem sprunghaften Kernwachstum, also einem präprophasischen Kernwachstum kommt und das Volumen dabei ungefähr verdoppelt wird (DOLEŽAL und TSCHERMAK-WOESS 1955, S. 181). Dies überprüften wir nun an *Haemanthus* in folgender Weise: Da die Mitosehäufigkeit im Dauergewebe im Gefolge der Heteroauxinbehandlung nicht so hoch ist, daß man bei völlig beliebiger Auswahl der Kerne annehmen könnte, eine ausreichende Zahl von präprophasischen Kernen zu erhalten, und da weiter die Mitosen häufig in Inseln auftreten, wurden solche Inseln aufgesucht und in 3–4 Gesichtsfeldern rund um diese die Ruhekerne ausgemessen. Die — wegen der besseren Vergleichbarkeit — aus einer einzigen Wurzel gewonnenen Volumenwerte fügen sich zu einem ausgesprochen zweigipfeligen Diagramm ganz nach dem Muster der Interphasenkerne aus dem Meristem zusammen (Abb. 4). Der einzige Unterschied besteht darin, daß die Ausgangsgröße der eigentlich ruhenden Kerne und dementsprechend auch das mittlere Volumen der präprophasischen Kerne höher als im Meristem liegt. Die mittleren Volumina der Kerne, die sich um die beiden Gipfel scharen, betragen  $M_I = 1411 \mu^3$  bzw.  $M_{II} = 2608 \mu^3$ . Der erstere Wert stimmt praktisch mit den Werten für die Ruhekerne aus den 3 unbehandelten, nicht mitotisch aktiven Wurzeln überein.  $M_I:M_{II}$  verhalten sich wie 1:1,84; die präprophasische Vergrößerung im Dauergewebe entspricht also völlig der präprophasischen Vergrößerung im Meristem. Mit anderen Worten: Die präprophasischen Kerne im Dauergewebe sind im Vergleich zu den präprophasischen aus dem Meristem im gleichen Maß vergrößert wie die eigentlich ruhenden Dauergewebekerne im Vergleich zu den posttelophasischen meristematischen, nämlich auch auf das rund 2fache Volumen.

#### Diskussion

Im Zusammenhang mit den zuletzt besprochenen Tatsachen ist folgendes auffallend. Das relative präprophasische Wachstum ist gleich, unabhängig, ob es sich in kleinen oder großen Kernen abspielt. Analoges zeigt sich auch im Zuge des endomitotischen Wachstums.

Unabhängig von der z. B. bei *Bryonia* in verschiedenen Geweben recht verschiedenen Ausgangsgröße der diploiden Kerne ist der Vergrößerungsfaktor beim Übergang von einer bestimmten zur nächst höheren Polyploidiestufe annähernd gleich (TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA 1954, S. 113). Auch erhält man bei verschiedenen Arten beim Vergleich der Volumina in endomitotisch polyploiden Trichomen nur dann klare Vergrößerungsreihen, wenn man von den bereits vergrößerten diploiden Kernen in den Initialen ausgeht und nicht etwa von ihren gewöhnlich viel kleineren Schwesterkernen in der Epidermis (TSCHERMAK-WOESS und HASITSCHKA 1953). Sowohl bei der endomitotischen Polyploidisierung wie bei dem prämitotischen Kernwachstum wird also anscheinend das extrachromosomale Material des Kernes in gleichem Maß vermehrt wie das Chromatin. Aus verschiedenen anderen Untersuchungen geht aber hervor, daß auch im gleichen Gewebe diese Beziehung sich unter Umständen ändern und *nur* eine Vermehrung der extrachromosomalen Proteine stattfinden und zu einem sogar rhythmischen Kernwachstum bei gleichbleibendem DNS-Gehalt und gleicher Chromosomengröße führen kann. Wie sich extrachromosomales Material und Chromatin (gemessen an der DNS-Menge) bei einem nicht der Vorbereitung auf die Mitose dienenden Kern- und Chromosomenwachstum auf gleicher Polyploidiestufe, also in unserem Fall beim Übergang der diploid bleibenden Kerne vom Meristem ins Dauergewebe verhalten, ist dagegen fraglich. Die Zunahme des Chromosomenvolumens auf das ungefähr 2fache ist jedenfalls so niedrig, daß sie sich bei Fehlen eines parallelen Anstieges der DNS ohne weiteres auch mit bloßen Unterschieden in der Spiralisierung erklären ließe. Es wäre also weiterhin wichtig, Objekte mit bedeutenderen Unterschieden in der Chromosomengröße in rein diploiden Geweben heranzuziehen.

Einen Versuch, die Beziehungen zwischen Kerngröße, DNS-Gehalt und Chromosomengröße zumindest zum Teil quantitativ zu erfassen, unternahmen übrigens ALFERT et alii (ALFERT und GOLDSTEIN; ALFERT und BALAMUTH). Sie erhielten in Kulturen des Ciliaten *Tetrahymena pyriformis* spontan eine Sippe mit größerem Mikronukleus von ungefähr doppelt so hohem DNS-Gehalt als bei der Ausgangssippe. Die Autoren führen beides auf eine Vergrößerung der Chromosomen bei gleichbleibender Zahl zurück, doch ist leider gerade dieser letztere Punkt noch nicht gesichert.

Ebenso ist es nicht ganz klar, wie es sich mit dem Chromosomenvolumen während der Furchungsteilungen im Mäuseei verhält. G. HERTWIG meint unter Berufung auf SOBOTTA, daß es sukzessive mit der von ihm festgestellten Abnahme des Kernvolumens vermindert wird. ALFERT, der einen — abgesehen von der üblichen präprophasischen Verdopplung — konstanten DNS-Gehalt findet und die Abnahme des

Kernvolumens mit einer Abnahme der extrachromosomalen Proteine erklären kann, meint dagegen, daß die Chromosomen mit dem Fortschreiten der Furchung nur kürzer und dicker werden.

### Zusammenfassung

Statistisch-volumetrische Untersuchungen an Chromosomen und Kernen von *Haemanthus katharinae* ergeben:

In Stecklings- sowie Keimlingswurzeln steigt das Chromosomenvolumen in der 3.—6. Periblem- bzw. Rindenschicht beim Übergang vom Meristem ins Dauergewebe auf das rund 2fache an.

In bezug auf das Kernvolumen ist zu berücksichtigen, daß das interphasische Wachstum im Meristem sich so wie bei anderen Pflanzen sprunghaft vollzieht, d. h. von einem posttelophasischen Wert ziemlich unvermittelt zum präprophasischen übergeht (Verhältnis der Mittelwerte 1:1,85). Der Eintritt in die Präprophase stellt die Vorbereitung auf die Mitose dar.

Im nicht mitotisch aktiven Dauergewebe gibt es nur eine Kategorie von Ruhekernen, und das mittlere Volumen derselben ist rund 2mal so hoch wie das der allein vergleichbaren posttelophasischen Ruhekerne aus dem Meristem. Das Kernvolumen nimmt also gleichsinnig und ungefähr in gleichem Maß wie das Chromosomenvolumen zu.

In mitotisch aktivem Dauergewebe (Heteroauxinbehandlung) kommt es zu einer präprophasischen Vergrößerung der Ruhekerne und damit zur Bildung von 2 Volumenkategorien. Das Verhältnis der Mittelwerte derselben stimmt mit dem Verhältnis im Meristem vollkommen überein, da die präprophasischen Kerne im Dauergewebe 2mal so groß wie die präprophasischen im Meristem sind.

Die vorliegenden Daten können als Grundlage für zukünftige DNS-Messungen dienen, mit welchen sie einen Hinweis auf die Vorgänge geben könnten, die dem Chromosomen- und Kernwachstum beim Übergang vom Meristem ins Dauergewebe zugrunde liegen.

### Literatur

- ALFERT, M.: A cytochemical study of oogenesis and cleavage in the mouse. *J. Cellul. a. Comp. Physiol.* **36**, 381—409 (1950). — ALFERT, M., and W. BALAMUTH: Differential micronuclear polyteny in a population of the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Chromosoma* **8**, 371—379 (1957). — ALFERT, M., and N. O. GOLDSTEIN: Cytochemical properties of nucleoproteins in *Tetrahymena pyriformis*. *J. of Exper. Zool.* **130**, 403—422 (1955). — CZEKA, G.: Strukturveränderungen endopolyploider Ruhekerne im Zusammenhang mit wechselnder Bündelung der Tochterchromosomen und karyologisch-anatomische Untersuchungen an Sukkulanten. *Österr. bot. Z.* **103**, 536—566 (1956). — DOLEŽAL, R., u. F. TSCHERMAK-WOESS: Verhalten von Eu- und Heterochromatin und interphasisches Kernwachstum bei *Rhoeo discolor*; Vergleich von Mitose und Endomitose. *Österr. bot. Z.* **102**, 158—185 (1955). — GETTLER, L.: Chromosomenbau. *Protoplasma-Monogr.*

14 (1938). — Kernwachstum und Kernbau bei zwei Blütenpflanzen. *Chromosoma* 1, 474—485 (1939/40). — Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. *Protoplasmatologia* (Wien) 6C (1953). — HOLZER, K.: Untersuchungen zur karyologischen Anatomie der Wurzel. *Österr. bot. Z.* 99, 118—155 (1952). — HERTWIG, G.: Der Furchungsprozeß des Mäuseeies. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* 45, 37—45 (1939). — HUGHES-SCHRADER, S., u. F. SCHRADER: Polyteny as a factor in the chromosomal evolution of the *Pentatomini* (Hemiptera). *Chromosoma* 8, 135—151 (1956). — LAUBER, H.: Untersuchungen über das Wachstum der Früchte einiger Angiospermen unter endomitotischer Polyploidisierung. *Österr. bot. Z.* 94, 30—60 (1947). — RIS, H.: Chromosome structure. In: *The chemical basis of heredity*, S. 26—62. Baltimore: Johns Hopkins Press 1957. — SOBOTTA, J.: Die Befruchtung und Furchung des Eies der Maus. *Arch. mikrosk. Anat.* 45, 15—93 (1895). — TSCHERMAK-WOESS, E., u. R. DOLEŽAL: Durch Seitenwurzelbildung induzierte und spontane Mitosen in den Dauergeweben der Wurzel. *Österr. bot. Z.* 100, 358—402 (1953). TSCHERMAK-WOESS, E., u. R. DOLEŽAL-JANISCH: Rhythmisches Kernwachstum während der mitotischen Interphase von *Vicia faba*. *Österr. bot. Z.* 103, 588—599 (1956). — TSCHERMAK-WOESS, E., u. G. HASITSCHKA: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. *Chromosoma* 5, 574—614 (1953). — Über die endomitotische Polyploidisierung im Zuge der Differenzierung von Trichomen und Trichozyten bei Angiospermen. *Österr. bot. Z.* 101, 79—117 (1954).

Dr. ELISABETH TSCHERMAK-WOESS,  
Botanisches Institut der Universität, Rennweg 14,  
Wien III (Österreich)



